

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de l'expression et de la fonction des protéines impliquées dans le réseau régulateur de DivK et de CtrA chez Brucella abortus

MIGNOLET, Johann

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX**

**NAMUR**

Faculté des Sciences

**ÉTUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA FONCTION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE RESEAU  
REGULATEUR DE **DivK** ET DE **CtRA** CHEZ *BRUCELLA ABORTUS***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Johann Mignolet

Juin 2004

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA FONCTION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LE RESEAU  
REGULATEUR DE DivK ET DE CtrA CHEZ *BRUCELLA ABORTUS***

MIGNOLET Johann

Résumé

L'intérêt scientifique résidant dans les bactéries du genre *Brucella*, à savoir son caractère pathogène, est simultanément un moteur intellectuel et un frein expérimental. Cette bactérie pathogène infectant de manière facultative certains mammifères, humains compris, du fait de son caractère virulent, doit être manipulée avec précaution à l'intérieur d'un laboratoire haute sécurité de niveau 3. Cet aspect la rend moins malléable en regard des paradigmes procaryotes tels *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. Pour cette raison, nous pouvons faire appel aux connaissances accumulées au sujet du modèle de différenciation procaryotique, à savoir *Caulobacter crescentus*. Sa parenté, au sein de la famille des  $\alpha$ -protéobactéries, avec le genre *Brucella* en fait une référence de poids pour appréhender avec *a priori* certains mécanismes moléculaires globaux se déroulant dans la bactérie pathogène. Un régulateur de réponse du système à deux composants au centre de l'un de ces mécanismes a particulièrement attiré notre attention, j'ai nommé CtrA. Contrôlant pas moins d'un quart des gènes régulés au cours du cycle cellulaire, cet acteur central de la division cellulaire est lui-même l'objet d'une régulation fine. Les histidine-kinases CckA, DivJ, DivL et PleC ainsi que le régulateur de réponse DivK affectent dans une certaine mesure l'état phosphorylé ou la protéolyse ciblée de CtrA. Ces cinq protagonistes, additionnés à CtrA, présentent chacun un homologue chez *Brucella*. La stratégie empruntée est de vérifier les fonctions et les modes d'action des acteurs en amont de CtrA chez *Brucella* à partir d'éléments connus chez *Caulobacter*. D'avance, nous savons que la régulation de CtrA comporte des différences : une histidine-kinase supplémentaire, PdhS, se grefferait en amont de DivK chez *Brucella* et est absente du génome de *Caulobacter*.

Trois approches complémentaires se chevauchant sont privilégiées dans l'étude des mécanismes de régulation post-traductionnelle de CtrA. Premièrement, les promoteurs de cinq de ces régulateurs sont clonés en amont de la séquence codante de la GFP afin de visualiser la présence/absence d'expression transcriptionnelle. Deuxièmement des outils sont créés qui permettent la localisation subcellulaire de ces protéines. Troisièmement, des mutants par délétion chromosomique sont sélectionnés et utilisés pour disséquer les liens génétiques unissant les divers partenaires. L'obtention d'un mutant *pleC* et la caractérisation de certains de ses phénotypes nous ont permis de formuler plusieurs hypothèses quant aux voies de régulations de CtrA et quant au processus de division de *Brucella*.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2004

**Promoteur :** Prof. X. De Bolle

**Co-promoteur :** Prof. J.-J. Letesson

Je commencerai par exprimer mon extrême gratitude envers les professeurs Xavier De Bolle et Jean-Jacques Letesson et Régis Hallez, respectivement promoteur, co-promoteur et tuteur de ce mémoire, pour m'avoir accordé une part non négligeable de leur temps que je sais précieux. Merci d'avoir attisé la ferveur scientifique dans mon esprit et de m'avoir accompagné durant cette bataille estudiantine.

Je ne pourrais décemment ficeler ce mémoire sans remercier les professeurs Xavier De Bolle, Jean-Jacques Letesson, Jean Vandenhautte ainsi que Régis et Maxime Wéry pour leurs discussions de haut vol qui ont donné un bon coup de pied intellectuel à l'avancement de la rédaction.

Je remercie aussi pt Marie, Valérie et Caroline pour la patience dont elles ont fait preuve lors d'explications prodiguées au sujet du Southern blot et des infections cellulaires.

Merci aussi aux anciens, Zette, Rose-May (félicitations pour ton petit bout) et Anne dont les conseils techniques avisés m'ont été d'une grande utilité.

Merci aux occupants du bureau squatté pendant presque 4 mois. Nico, ta culture cinématographique et musicale m'ont impressionné. John, mes problèmes informatiques se sont rapidement évanouis en ta présence. Chantal, merci de m'avoir rappelé que ce n'était pas mon bureau, cela m'a fait me sentir chez moi.

Merci à tous mes pairs. Richard, continue à surprendre le monde qui t'entoure de tes remarques originales et déstabilisantes. Julien, nos échanges verbaux et informatiques m'ont été plus que bénéfiques. Cédric, arrête de manipuler sinon nous ne pourrions pas mettre en œuvre nos projets de spectacle au Zénith. Aurore, Stéphanie et Anne-Michèle, les petits conciliabules à la volée dans les couloirs m'ont été d'un grand secours psychologique et ont aiguisé mon sens de la répartie.

Merci au clan GEMO pour m'avoir supporté lors des temps d'attente inhérents à une expérience.

Je remercie également le professeur Jean Vandenhautte pour avoir été l'instigateur involontaire du mot du jour.

Merci à ceux que je n'ai pas déjà cités. Gd Marie, Sandrine, Sophie et Christian, je ne pouvais pas omettre de vous évoquer dans ces remerciements.

Je remercie les souches de *Brucella* qui ont bien voulu répondre à l'appel. Sans elles, ce mémoire aurait avorté.

En bref, merci à tous, professeurs, chercheurs, techniciens, mémorants, stagiaires pour l'instauration d'un cadre et d'une ambiance hors pairs où il fait bon s'épanouir. J'espère que mon humour (ironie ou cynisme ?) et mes réflexions intempestives sur tout et n'importe quoi ont été considérés à leur juste valeur, c'est-à-dire en tant que marques d'affection.

Merci d'avance à vous, membres du jury, qui allez lire ce manuscrit et y consacrer votre temps.

Pour clôturer, cette partie qui me tient à cœur, j'aimerais citer tous ces protagonistes restés dans l'ombre pendant mes heures de travail et à qui je dois la majeure partie de mon entrain. Mille mercis à ma famille pour ces 22 ans de bonheur. Merci à Sabrina pour ces 6 dernières années passées à se découvrir. Merci au publikot pour sa porte demeurant toujours ouverte à toutes heures du jour et de la nuit. Merci à la kyrielle de cokoteuses d'avoir irisé ces quatre années d'université. Merci à tous les biologistes de Namur pour cette diversité de personnages. Enfin, merci à cette filleule souhaitée de bientôt voir le jour.

# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>3</b>
<b>Introduction</b>	<b>5</b>
<b>Curriculum vitae</b>	<b>5</b>
<b>Arbre généalogique</b>	<b>7</b>
<b>Le paradoxe du paradigme</b>	<b>7</b>
<b>La vie d'un paradigme</b>	<b>8</b>
Le cycle aperçu au microscope : une esquisse <small>(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003, Skerker and Laub, 2004)</small>	9
Analyses à large échelle	10
Le réseau régulateur	10
Le signalling : un nœud gordien	12
Information positionnelle et échafaudage moléculaire	16
<b>Transpositions et extensions systémiques</b>	<b>17</b>
Atavisme familial	17
Variations fondamentales (thèse A.-F. Bellefontaine)	18
Données complémentaires chez <i>B. abortus</i> (R. Hallez, thèse en cours)	19
<i>Sinorhizobium meliloti</i> , un tremplin pour <i>Brucella</i>	19
<b>Objet du mémoire</b>	<b>20</b>
<b>Résultats et discussions</b>	<b>22</b>
<b>Fusions promoteur - <i>gfp</i></b>	<b>23</b>
Construction de l'outil plasmidique	23
Activité des promoteurs en milieu liquide	25
Activité des promoteurs en condition infectieuse	26
<b>Discussion</b>	<b>29</b>
<b>Localisation subcellulaire</b>	<b>31</b>
Construction des vecteurs d'entrée	31
Construction des vecteurs de destination	33
Construction des vecteurs d'expression	35
<b>Discussion</b>	<b>35</b>
<b>Obtention et caractérisation de délétants</b>	<b>37</b>
Construction de l'outil plasmidique	37
Caractérisations phénotypiques	42
<b>Discussion</b>	<b>46</b>
<b>Conclusions générales et perspectives</b>	<b>48</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	<b>52</b>
<b>Souches et plasmides</b>	<b>52</b>
Souches	52
Plasmides	52
<b>Milieus et solutions</b>	<b>54</b>
Milieux de culture	54
Solutions	54

<b>Techniques relatives à l'ADN</b>	<b>55</b>
Polymerase chain reaction (PCR)	55
Électrophorèse en gel d'agarose	56
Restriction sur plasmide	56
Ligation d'un plasmide	57
Purification sur gel	57
Purification sur colonne	57
Minipréparation de plasmide	57
Midipréparation de plasmide	57
Séquençage	58
Clonage Gateway™	58
Extraction d'ADN génomique	59
Southern blot	60
<b>Techniques relatives au matériel biologique</b>	<b>62</b>
Transformation bactérienne : choc thermique	62
Le test blanc/bleu : l' $\alpha$ -complémentation	62
Conjugaison	63
Coloration (de) Gram	64
Infection de cellules hôtes	64
<b>Techniques ayant trait aux anticorps</b>	<b>66</b>
Marquage immunocytochimique	66
<b>Techniques ayant trait à la microscopie</b>	<b>66</b>
Appareillage	66
Préparation d'échantillons de microscopie à fluorescence	66
Molécules fluorescentes	67
<b><i>Bibliographie</i></b>	<b>69</b>
<b><i>Iconographie</i></b>	<b>73</b>

# Liste des abréviations

Abrév.	Nom complet	Explication complémentaire
Amp	Ampicilline	Antibiotique
BaXyzX		La protéine XyzX de l'espèce <i>Brucella abortus</i>
bla	β-lactamase	Gène de résistance à l'ampicilline
BrXyzX		La protéine XyzX des espèces du genre <i>Brucella</i>
BSA	Bovine serum albumin	Albumine sérique de bœuf
cat	Cm-acétyltransférase	Gène de résistance au chloramphénicol
CcXyzX		La protéine XyzX de l'espèce <i>Caulobacter crescentus</i>
CDS	Coding sequence	Séquence codante d'une protéine
CFP	Cyan fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le bleu
Cm	Chloramphénicol	Antibiotique
DIC	Differential interference contrast	Mode d'observation en microscopie photonique
DO	Densité optique	Mesure, entre autres, le nombre de bactéries
e.g.	Exempli gratia	Par exemple
FACS	Fluorescence activating cell-sorting	Technique permettant de trier les cellules selon un critère prédéfini.
Gen	Gentamycine	Antibiotique
GFP	Green fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le vert
GW <sup>TM</sup>	Gateway <sup>TM</sup>	Technique de clonage par recombinaison
HK	Histidine-kinase	Acteur du système à deux composants
Hpt	Histidine phosphotransférase	Acteur du système à deux composants
IPTG	Isopropyl-thio-galactopyranoside	Inducteur du <i>Plac</i> par répression de LacI
Kan	Kanamycine	Antibiotique
KDa	Kilodalton	10 <sup>3</sup> Daltons (unités de masse moléculaire)
Kpb	Kilo paires de base	10 <sup>3</sup> paires de bases nucléotidiques
LB	Luria Bertani	Milieu de culture riche pour bactéries
LPS	Lipopolysaccharide	Feuillet lipidique externe de la membrane externe des Gram négatives
Mb	Mégabases	10 <sup>6</sup> paires de bases nucléotidiques
MOI	Multiplicity of infection	Calcul du nombre de bactéries/hôte
Nal	Acide nalidixique	Antibiotique
Npt ou kan <sup>R</sup>	Néomycine phosphotransférase	Gène de résistance à la kanamycine
OFG	Our favorite gene	Notre gène d'intérêt

ORF	Open reading frame	Phase ouverte de lecture
pb	Paire de base	Deux nucléotides appariés
PBS	Phosphate buffer saline	Solution phosphatée saline à osmolarité physiologique
PCR	Polymerase chain reaction	Technique d'amplification de fragments ADN
PFA	Paraformaldéhyde	Fixateur utilisé pour l'observation sous microscope
rpm	Rotation par minutes	Unité de centrifugation
RPMI		Milieu de culture pour cellules eucaryotes
RR	Régulateur de réponse	Acteur du système à deux composants
ts, cs	Thermo- , cryosensible	Létalité d'une souche à température élevée, basse.
YFP	Yellow fluorescent protein	Protéine fluorescente qui émet dans le jaune

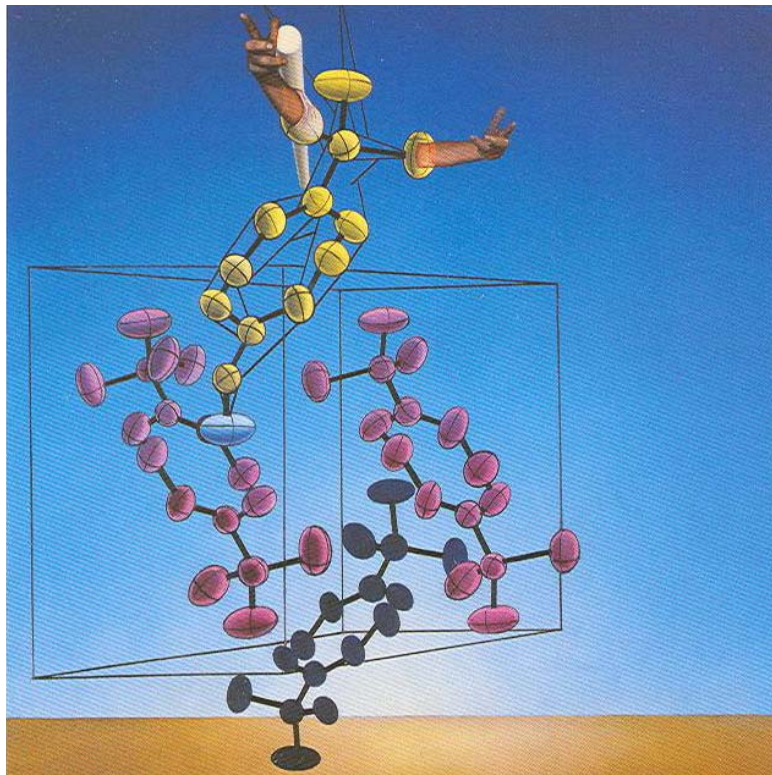


Au commencement était la simplicité.

Richard DAWKINS, *Le gène égoïste*.

Si nous nous remémorons que Daath est situé au Point où l'Abîme sépare le Pilier du Milieu, que sur ce Pilier du Milieu existe le Sentier de la Flèche... que là aussi gît Kundalinî, nous voyons qu'en Daath est contenu le mystère de la génération et de la régénération, la clef de la manifestation de toutes choses, par leur différenciation en Paires d'Opposés et leur Union dans le Troisième Terme.

Dion FORTUNE, *The mystical Qabalah*.



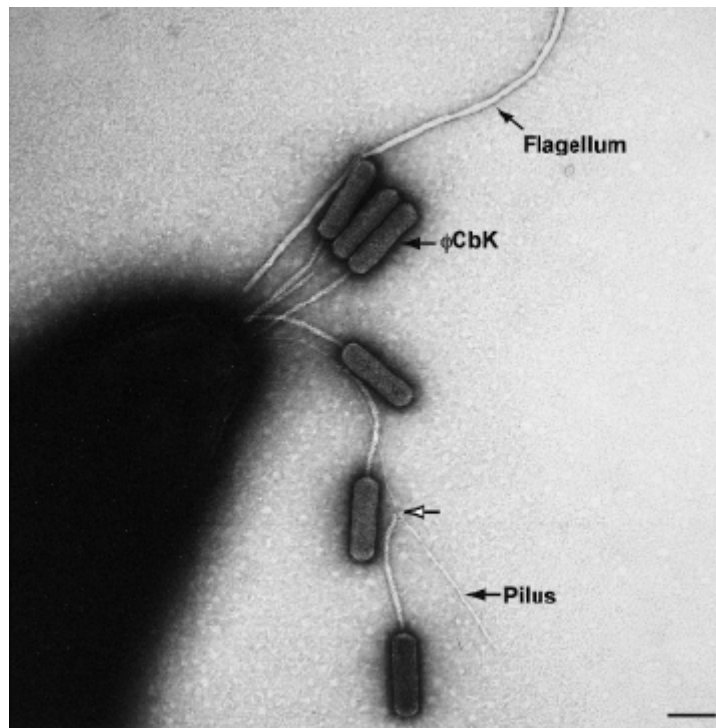
*La estructura del ADN. Salvador Dalí*



# Avant-propos

Dans un monde tel que le nôtre où les conditions extérieures sont en perpétuel remaniement, il est capital pour la pérennité d'une cellule vivante que celle-ci perçoive dans un délai relativement court l'état et de son environnement et de son milieu interne. Le but évident de cette action étant de faire face à ou d'éviter un danger biologique, chimique ou physique éventuel. Deux adaptations distinctes ont été développées dans cette optique par le monde biologique. D'un côté, les animaux sont pourvus d'une cascade de transduction du signal dont le maillon senseur est généralement un récepteur tyrosine kinase en membrane pouvant dimériser et se transphosphoryler sur leurs résidus tyrosines à la réception d'un signal. Ensuite, le signal est transféré jusqu'à sa cible ultime (facteur de transcription, enzyme, protéine, etc.) via un jeu de phosphorylations-déphosphorylations protéiques. Étant donné le caractère homéostatique des animaux supérieurs, ces signaux sont, dans un bon nombre de cas, des hormones ou en règle générale des constituants internes de l'organisme. De l'autre côté, les procaryotes, les champignons et les plantes ont opté pour un système quelque peu différent mais dont la logique reste identique, à savoir le système à deux composants<sup>(Hoch, 2000)</sup> (Fig. 1). Comme son nom l'indique, il est constitué de deux protagonistes. Le premier, une histidine-kinase (HK) autrement appelée kinase sensitive, comporte un domaine senseur, un domaine de liaison à l'ATP, un domaine portant l'histidine phosphorylable et souvent un domaine transmembranaire. Le second, appelé régulateur de réponse (RR), est constitué d'un domaine receveur doté d'un résidu aspartate phosphorylable ainsi que d'un domaine qui modulera la réponse à fournir et qui se trouve être un domaine régulateur transcriptionnel dans la plupart des cas. Muni de ces deux acteurs, le mécanisme de transmission du signal ainsi constitué est simple et modifiable (Fig. 2a). À partir d'un signal externe aussi bien qu'interne que l'HK perçoit par son domaine senseur, cette dernière s'autophosphoryle sur le résidu histidine grâce à la prise du  $\gamma$ -phosphate porté par une molécule d'ATP. Le groupement phosphate est par après transféré d'une manière spécifique au RR apparenté sur le résidu aspartate du domaine receveur. D'une manière générale, cette action a pour effet d'activer le domaine modulateur de réponse et permet par exemple la liaison à l'ADN. Comme spécifié ci-dessus, principalement deux variantes existent à ce système. Premièrement, certains transferts de phosphate ne s'effectuent plus de façon simple entre ces deux acteurs mais le long d'une cascade ou phosphorelay qui, au départ d'une HK et menant invariablement au RR, comporte d'autres régulateurs de réponse et histidine phosphotransférases (Hpt) intermédiaires établissant une jonction indirecte entre HK et RR (Fig. 2b). Cette augmentation du nombre de partenaires et d'acteurs, loin d'être pur gaspillage, permet une régulation plus fine du pathway qui conduit à l'édification d'une réponse ad hoc aux besoins cellulaires. Le second cas est constitué par les kinases hybrides, kinases particulières dont un domaine aspartate receveur est abouté génétiquement en C terminal à la kinase sensitive initiale. Ce cas de figure implique ipso facto une Hpt intermédiaire reliant la kinase hybride au RR.

# Introduction



Attaque de *Caulobacter crescentus* par le phage CbK. (Skerker and Shapiro, 2000)

# Introduction

*M*algré une proportion minime de bactéries pathogènes noyées dans un flot d'innombrables procaryotes dont l'action est bénéfique à notre organisme, l'être humain se doit d'appréhender en priorité les phénomènes à la base de leur virulence et ainsi espérer endiguer les ravages qui, dans quelques cas, représentent de véritables fléaux pour notre espèce. Parce que les organismes microscopiques ont une horloge évolutive tournant en accéléré par rapport à celles des espèces pluricellulaires dites évoluées, les antibiotiques, solutions d'hier, tendent à devenir de maigres remparts aisément contournés par l'acquisition de multi-résistances, cas notamment pour *Staphylococcus aureus*, cause principale de maladies nosocomiales. Cet état de fait nous contraint à chercher d'autres molécules antimicrobiennes, drogues ou procédés curatifs intervenant quelquefois à des niveaux beaucoup plus spécifiques ce qui diminue le spectre de maladies traitables. Pour agir spécifiquement sur une ou plusieurs espèces bactériennes, il est nécessaire d'établir l'architecture commune des différents mécanismes moléculaires qui participent au bon déroulement du cycle infectieux. Néanmoins, il est indispensable de garder à l'esprit que chaque expérience effectuée, chaque test réalisé, chaque modélisation de l'architecture est à rapporter, d'une façon ou d'une autre, au caractère virulent de la bactérie. Conceptualiser et éprouver des modèles au sujet du cycle cellulaire dans un but de généralisation est absurde à partir du moment où aucun branchement avec la pathogénie n'est établi et ce pour la simple et bonne raison qu'une bactérie pathogène est un sujet d'étude techniquement et biologiquement contraignant en regard des bactéries avirulentes utilisées en tant que paradigmes du cycle cellulaire tels *Bacillus subtilis* pour les Gram positives et *Escherichia coli* pour les Gram négatives.

Avant de plonger dans le vif du sujet, je dévoilerai simplement l'articulation du travail exposé ci-après. Celui-ci débutera par une brève présentation du sujet d'étude, en l'occurrence une bactérie pathogène, de sa place dans la biosphère et de son entourage phylogénétique. En deuxième lieu, il abordera les ennuis concernant l'étude de ce type de bactérie et la nécessité de se référer à un modèle disséqué en long et en large, avec évidemment une présentation en bonne et due forme de ce modèle. Pour couronner le tout, ce travail touchera un mot des différences/similitudes observées entre modèle et sujet d'étude.

## Curriculum vitae

La bactérie infectieuse Gram négative sur laquelle nous nous focaliserons tout au long de cette étude se nomme *Brucella*. Coccobacille de 1,2  $\mu\text{m}$  de long sur 0,8  $\mu\text{m}$  de large (Fig. 3) appartenant à la classe hétéroclite au point de vue morphologie et mode de vie des  $\alpha$ -protéobactéries (Tab. 1), le genre *Brucella* contient plusieurs types de pathogènes intracellulaires facultatifs alternant, selon l'opportunité, entre vie libre et cycle infectieux responsable de la brucellose. Plusieurs espèces sont décrites<sup>(Allardet-Servent *et al.*, 1988)</sup> à ce jour comme infectant chacune un groupe très précis de mammifères. Sans souci d'exhaustivité, citons *B. suis* qui établit résidence chez les suidés (porcins, sangliers, ...) et *B. melitensis* chez

les caprins et les ovins et dont les génomes sont totalement séquencés et annotés (Scranton University et TIGR), *B. abortus* infectant de préférence les animaux composant le bétail et dont le génome séquencé et annoté n'est pas encore disponible, *B. canis*, *B. ovis*, *B. cetaceae* et *B. pinnipediae* élisant domicile respectivement chez les canidés, les ovins, les cétacés et les pinnipèdes (phoques, morses,...). Cependant, quelques cas isolés de transmission à l'homme sont susceptibles de se produire via un contact direct avec un animal infecté, ou une de ses sécrétions et particulièrement le lait. Ce mode de propagation de la maladie est devenu exceptionnel en Europe, mais absolument pas dans les pays en voie de développement où la zoonose provoque toujours des ravages<sup>(Boschioli et al., 2001)</sup>. Les rares personnes encore atteintes dans nos contrées sont des scientifiques travaillant sur cet agent infectieux, des vétérinaires ou des éleveurs. Remarquons que, de manière intrigante, la transmission à l'homme est artéfactuelle car celui-ci se révèle être un « cul-de-sac » infectieux pour la bactérie.

Par contraste avec la majorité du monde procaryote, les bactéries appartenant au genre *Brucella*, à l'exception de *B. suis*, arborent deux chromosomes totalisant environ 3,2 Mb. La communauté scientifique penche vers l'hypothèse d'une origine plasmidique du petit chromosome devenant indispensable au cours de l'évolution par incorporation de gènes essentiels. Cependant, une excision à partir d'un mégachromosome initial n'est pas à exclure<sup>(Michaux et al., 1993, Jumas-Bilak et al., 1998)</sup>.

Devant son nom à Sir David Bruce, la brucellose, précédemment connue sous le nom de « fièvre de Malte » ou de « fièvre ondulante », est une maladie globale à symptômes systémiques atypiques. Faiblesse, fatigue, perte d'appétit, céphalée, douleurs articulaires le tout accompagné de fièvre tard dans la journée sont seules capables de renseigner le médecin sur le diagnostic à poser. Une minorité de personnes infectées développent une maladie chronique pendant qu'une majorité se rétablit en quelques semaines sans traitement. Pour confirmer son diagnostic, le médecin a deux possibilités : une culture de bactéries à partir du sang ou d'un organe du patient ou alors un test ELISA qui titrera les anticorps dirigés contre plusieurs antigènes de *Brucella*. Aucun vaccin éprouvé avec entière satisfaction n'ayant à ce jour été généré pour l'homme, la prophylaxie se borne à la prise de précaution pour les personnes à risques, scientifiques et vétérinaires, et à la pasteurisation du lait. Deux traitements de la maladie existent qui reposent sur trois antibiotiques : doxycycline et streptomycine (remplaçable par de la gentamycine) ou doxycycline et rifampicine, chaque traitement étant à prendre pendant six semaines<sup>(Jay P. Sanford et al., 1997)</sup>.

Nonobstant la spécificité d'hôte de chaque espèce, la logique d'invasion et d'échappement au système immunitaire demeure constante<sup>(Celli and Gorvel, 2004)</sup> (Fig. 4). Une fois à l'intérieur de son hôte, la bactérie gagne les voies lymphatiques où, après un temps plus ou moins long, elle se fait phagocyter par une cellule spécialisée (PMN, Macrophage,...). À cet instant, *Brucella* se trouve dans un endosome primaire et semble ne plus entamer de nouveaux cycles de réplication. Le schéma normal de phagocytose continue et l'endosome primaire fusionne avec un endosome tardif, forçant par ce fait la bactérie à résister à une acidification du milieu. Notons que cette acidification s'avère être requise à l'induction des facteurs de virulence<sup>(Porte et al., 1999)</sup>. Quelque part entre cette étape et la fusion lysosomiale, la bactérie va court-circuiter la voie classique et dévier le trafic vacuolaire à son avantage pour se confectionner une niche de réplication dans une vacuole présentant certains marqueurs de réticulum endoplasmique<sup>(Pizarro-Cerda et al., 1998a)</sup>. Le phagocyte infecté, véritable cheval de Troie, fournit à son pseudo-repas l'occasion de se répandre insidieusement dans l'organisme tout entier et d'envahir préférentiellement les tissus lymphoïdes, les os, l'endocarde, les organes reproducteurs (notamment le trophoblaste, tissu épithélial placentaire) et le cerveau<sup>(Pizarro-Cerda et al., 1998b)</sup>.

## Arbre généalogique

Comme cité précédemment, la classe des  $\alpha$ -protéobactéries à laquelle appartient *Brucella* est hautement diversifiée<sup>(Moreno, 1998)</sup> (Fig. 5). Elle comprend entre autres des symbiontes de légumineuses tels *Sinorhizobium meliloti* et *Mesorhizobium loti* évolutivement proches de *Brucella*, des pathogènes de plantes tels *Agrobacterium tumefaciens*, des pathogènes intracellulaires obligatoires d'animaux tels *Rickettsia prowazekii* (agent infectieux du typhus), *Rickettsia conorii*, des pathogènes intracellulaires facultatifs d'animaux tels *Bartonella henselae*, des bactéries pourpres telles *Rhodopseudomonas palustris* et des bactéries ubiquistes vivant à l'état libre telles *Caulobacter crescentus* et *Rhodobacter capsulatus*. Ce rassemblement taxonomique peut paraître de prime abord extravagant dans la mesure où nous nous basons uniquement sur leurs préférences environnementales. À y regarder de plus près, nous remarquons que les similitudes entre ces différentes espèces sont situées au niveau de l'organisation interne et, postulons-nous, au niveau du cycle cellulaire. Par ailleurs, ce n'est pas tant le cycle cellulaire en lui-même qui est conservé, mais les acteurs influençant le bon déroulement de ce cycle. Un acteur central essentiel est particulièrement bien conservé parmi le groupe des  $\alpha$ -protéobactéries, j'ai nommé le régulateur de réponse CtrA. La cascade de signalisation qui mène à CtrA, quant à elle, répond à la même observation sans exclure quelques écarts du type ajout et/ou suppression d'acteurs. Opposé à cette constatation, les voies de régulation et les produits de gène contrôlés par CtrA s'écartent nettement plus d'un canevas commun<sup>(Bellefontaine et al., 2002)</sup>. Ceci ne révèle rien de surprenant, l'acteur central étant censé générer via ses cibles des comportements divers et adaptés en accord avec le mode de vie de chaque espèce et qui répondent à leurs besoins spécifiques. En bref, toutes les bactéries de ce groupe ont préservé un noyau commun central auquel arrive un input initial transitant par une voie de signalisation peu modifiée au cours de l'évolution et duquel part un output variable d'une espèce à l'autre qui explique la diversification comportementale observée.

## Le paradoxe du paradigme

L'atout qui rend *Brucella* attrayante d'un point de vue scientifique, à savoir son aspect pathogénique, est simultanément l'inconvénient limitant notre marge de manœuvre expérimentale. En effet, la manipulation directe de la bactérie vivante doit s'effectuer obligatoirement dans un laboratoire de haute sécurité (BL3) pour répondre à des normes légales. Ce facteur ralentit notablement l'avancement d'une étude en cours, d'autant plus s'il est couplé à des manipulations de composants radioactifs ou s'il nécessite l'utilisation d'appareillages onéreux et « contaminables », e.g. un FACS. En surimpression, *Brucella* est une bactérie à temps de génération relativement important, de l'ordre de 2 à 3 h, ce qui restreint davantage le nombre d'expérimentations possibles en un temps limité. Pour toutes ces raisons, notre modèle de pathogénie n'est pas un outil malléable à souhait. Tenter une étude à l'aveugle, c'est-à-dire sans *a priori*, est une opération risquée où les résultats incertains se font attendre. De plus, *Brucella* ne présente pas de phénotypes morphologiques patents du genre flagelle, pilus, division asymétrique prononcée, facilement identifiables en microscopie. Par souci d'exactitude, précisons qu'elle arbore un flagelle et qu'elle se divise

de façon asymétrique, mais que ces deux phénotypes sont fugaces et peu marqués ce qui les rend difficilement utilisables lors d'un crible au microscope. Une solution adaptée consiste à examiner le pathway d'intérêt chez un organisme apparenté évolutivement et ensuite de le comparer *in silico* avec celui de la bactérie d'intérêt. À partir des similitudes/dissembances repérées, il reste à inférer les expériences à effectuer pour vérifier et confirmer/infirmier l'hypothèse de départ qui consiste à postuler que les acteurs communs du pathway ont des rôles similaires voire identiques et à interpréter la fonction des acteurs spécifiques à la souche d'intérêt. En l'occurrence, le pathway qui nous occupera pendant le reste de ce travail et l'organisme de référence sur base duquel nous décortiquerons *a posteriori* ce pathway sont respectivement la voie de signalisation qui mène à CtrA et *Caulobacter crescentus*. Idéalement, nous aurions dû nous étayer sur *Sinorhizobium* en raison de sa parenté évolutive plus grande et sa ressemblance morphologique avec *Brucella*. Toutefois, *Caulobacter* est l'organisme le plus étudié et le mieux décrit dans la littérature parmi les  $\alpha$ -protéobactéries en ce qui concerne CtrA et ses partenaires. En fait, si *Caulobacter* est tellement sujet à toutes sortes d'expérimentations, c'est parce qu'il constitue le paradigme par excellence du cycle cellulaire dans le cadre d'une division asymétrique obligatoire.

Une fois ce modèle en main pour commencer le jeu de comparaison, il est impératif de ne pas perdre de vue un point essentiel. Le statut de paradigme alloué à *Caulobacter* est à l'origine d'un raisonnement erroné lorsqu'une transposition *a priori* entre modèle et organisme d'intérêt est automatiquement inférée sans aucune autre forme de vérification. La phrase suivante semble faire figure de tautologie, cependant les conclusions tirées quant aux actions et aux fonctions des acteurs protéiques de l'organisme modèle, quand bien même les homologues sont conservés chez l'organisme d'intérêt, ne sont valables et uniquement valables que pour le paradigme et ce tant que des expériences pertinentes supplémentaires au sujet de l'organisme d'intérêt ne sont pas venues corroborer les hypothèses transposées. Même si on ne s'attache qu'à l'aspect « cycle cellulaire » de manière générale, ce modèle, en espérant rendre compte d'un maximum de systèmes bactériens, en réalité ne rend compte totalement que de son propre système, il n'est un modèle absolu que pour lui-même. Plus les acteurs du système sont remaniés tant au niveau séquence protéique qu'au niveau ajout/suppression de partenaires, plus la transposition sera délicate et plus le modèle initial sera à remettre en cause. De la sorte, une distance phylogénétique élevée pourra poser le même type de problème. On pourrait penser ce paradoxe simplement théorique mais il est d'application entre *Caulobacter* et *Brucella* pour le régulateur CtrA. En effet, malgré 81% d'identité entre l'homologue de chaque espèce, il semble qu'un grand nombre de cibles de CtrA diffèrent selon l'espèce<sup>(Bellefontaine *et al.*, 2002)</sup>, non seulement parce que les sites d'atterrissage du régulateur ne sont pas nécessairement localisés devant les gènes présents chez les deux espèces, mais surtout parce que chaque espèce a acquis des gènes propres.

Conscient de ce paradoxe, le modèle demeure un avantage de poids puisqu'il ouvre très facilement le champ d'hypothèses de travail, à partir d'une analyse théorique. Notons également que les variantes envisagées d'un modèle à un autre enrichissent la compréhension du système.

## La vie d'un paradigme

*Caulobacter* est une bactérie ubiquiste, apte à survivre dans des environnements fortement dilués en nutriments, qui intervient dans le recyclage global du carbone<sup>(Poindexter, 1981)</sup>. Son



cycle de vie très particulier aboutissant à une division asymétrique obligatoire (Fig. 6) en fait un modèle pertinent pour l'étude de la différenciation chez les procaryotes. Le dimorphisme inhérent à cette espèce se manifeste par la conception, à chaque cycle d'une première cellule pourvue d'une organelle polaire nommé indifféremment prostheca ou stalk ainsi que d'une seconde cellule monoflagellée à l'un de ses deux pôles. De manière intéressante, il souligne une problématique courante en biologie qui tente de mettre en exergue comment deux programmes de vie complètement différents peuvent être encodés par un seul et unique génome. En ce qui concerne le pourquoi, nous pouvons émettre l'hypothèse admettant que, face à un environnement dilué, la bactérie stalkée adhérant fermement à un substrat fonctionne comme une usine à générer des cellules flagellées dont le but ultime sera de rechercher un nouvel environnement mieux chargé en nutriments et de le coloniser en s'y différenciant en cellule stalkée. Ce comportement aurait pour effet de diminuer la compétition intraspécifique. Outre son dimorphisme, *Caulobacter* présente deux avantages : tout d'abord, la progression d'une bactérie à l'intérieur du cycle est aisément traçable par le biais de plusieurs phénotypes « macroscopiques » comme le chimotactisme, la mobilité du flagelle, la résistance/sensibilité aux phages CbK due à l'absence/présence de pili. Ensuite, il est relativement simple de synchroniser une population grâce à la séparation physique des cellules stalkées et des cellules flagellées par centrifugation dans un gradient de densité<sup>(Evinger and Agabian, 1977)</sup>. De plus, depuis peu, son génome est complètement séquencé et annoté<sup>(Nierman et al., 2001)</sup>. Tous ces facteurs réunis contribuent à l'engouement qui touche la dissection biologique, génétique et biochimique de cette bactérie.

Le terme *crescentus* lui a été attribué en raison de sa forme en croissant de lune (Fig. 7). Cette morphologie est due à la crescentine, une protéine homologue aux protéines constituant les filaments intermédiaires eucaryotiques, polymérisant en un long filament hélicoïdal qui relie les deux pôles de la cellule<sup>(Ausmees et al., 2003)</sup>. La raison potentielle de cette forme insolite pourrait résider dans le fait qu'elle confère une meilleure pénétrance dans l'eau impliquant une réduction de la dépense énergétique ou une aire de dispersion plus étendue.

## **Le cycle aperçu au microscope : une esquisse**<sup>(Ausmees and Jacobs-Wagner, 2003; Skerker and Laub, 2004)</sup>

Conventionnellement, le cycle hautement coordonné débute au départ d'une cellule flagellée nageuse (Fig. 8). Munie d'un flagelle mobile et de pili de type IV (médiateurs d'adhésion aux substrats) à l'un des deux pôles, ainsi que d'un système de chimotactisme fonctionnel, et incapable d'initier la réplication de son chromosome, cette cellule cherche un milieu propice à sa survie (phase G1). Celui-ci atteint, la cellule flagellée va entamer sa métamorphose en cellule stalkée via une phase dite de transition G1-S lors de laquelle elle éjecte son flagelle, rétracte ses pili, forme un nouveau prostheca à l'ancien pôle flagellé par évagination des membranes internes et externes et de la paroi muréique sans infiltration d'ADN ni de ribosomes. À son extrémité, se présente une structure dense nommé holdfast dont la fonction est d'ancrer la bactérie à son substrat.

A cet instant, la nouvelle cellule stalkée est susceptible de réagir de deux manières différentes suivant les conditions environnantes. Soit le milieu est pauvre, notamment en phosphate inorganique, et la cellule, au lieu de se diviser, allonge son stalk pour augmenter la surface de contact milieu - cytoplasme et ainsi augmenter l'apport en nutriments, soit le milieu lui est favorable et elle croît tout en, phénomène jusqu'ici rapporté exclusivement aux eucaryotes, initiant la réplication de son ADN une unique fois avant d'inhiber toutes nouvelles réplications ultérieures.

La cellule, en initiant une réplication (phase S), passe à un état prédivisionnel précoce et glisse vers un état prédivisionnel tardif en synthétisant un nouveau flagelle non fonctionnel au pôle opposé au stalk, en ségréguant ses chromosomes et en entamant une constriction transversale. Le parachèvement de cette constriction (phase G2) et la séparation irrévocable des cellules filles mènent directement, d'une part, à l'acquisition de la mobilité du flagelle et à la biogenèse des pili chez la nouvelle cellule flagellée, et d'autre part, à l'initiation de la réplication chromosomique chez la nouvelle cellule stalkée. En définitive, les deux cellules filles obtenues sont physiologiquement et morphologiquement distinctes suivant chacune leur destinée propre, division pour la cellule stalkée et dispersion pour la cellule flagellée.

## Analyses à large échelle

Depuis la publication du génome (4 Mb) de *Caulobacter*, les caractérisations génétiques et protéiques dites « one at a time » ont été complétées par deux approches globales : les damiers à ADN ou microarrays<sup>(Laub et al., 2000)</sup> et la protéomique<sup>(Grunenfelder et al., 2001)</sup>. La première technique a non seulement montré que 553 des 3767 gènes de *Caulobacter* (15%) sont transcriptionnellement régulés au cours du cycle cellulaire, mais elle a aussi mis en lumière un phénomène capital et, somme toute, logique pour qu'une bactérie soit compétitive : chaque produit de gène est exprimé au moment opportun avec une précision ahurissante assurant la coordination d'événements se succédant et l'optimisation de l'utilisation des ressources. D'autre part, les microarrays ont prouvé l'existence de cascades régulatrices dans le cas de la biogenèse du flagelle et des pili (Fig. 9).

La protéomique, seconde technique, outre la corrélation avec les microarrays, a établi l'impact de la protéolyse, moyen irréversible de contrôle sur le taux d'une protéine, dans le déroulement et la transition des événements du cycle.

## Le réseau régulateur

Une des toutes premières observations importantes concernant *Caulobacter* est le couplage de la réplication du chromosome et de la biogenèse du flagelle<sup>(Sheffery and Newton, 1981)</sup>. Face à cette coordination stupéfiante d'événements en apparence indépendants, il est légitime de suspecter un régulateur commun vraisemblablement essentiel unissant progression le long du cycle et morphogenèse polaire. Un crible de mutants thermosensibles (ts) affectés à température permissive dans l'expression de *fliQ* (gène flagellaire de classe II) et développant à température restrictive un phénotype létal a pêché le régulateur de réponse CtrA<sup>(Quon et al., 1996)</sup> (notons qu'un crible similaire a attrapé la kinase hybride CckA<sup>(Jacobs et al., 1999)</sup>). Appartenant à la famille des systèmes à deux composants, il se compose d'un domaine régulateur de réponse phosphorylable sur son résidu aspartate 51 (D51) et d'un domaine de liaison à l'ADN atterrissant sur un motif 9-mère<sup>(Ouimet and Marczynski, 2000; Laub et al., 2002)</sup>.

### Dissection du régulon (Fig. 10)

Deux fonctions sont attribuées au facteur de transcription CtrA. La première consiste à inhiber l'initiation de la réplication chromosomique. En se liant à cinq boîtes au niveau l'origine de réplication, CtrA provoque un encombrement stérique qui empêche le recrutement de la machinerie d'initiation de la réplication<sup>(Quon et al., 1998)</sup>. La seconde fonction, implicite pour un facteur de transcription, lui permet de réguler la transcription de 95 gènes (distribués en 55 opérons), 66 positivement et 29 négativement, incluant le contrôle de gènes impliqués dans la régulation, la division (*ftsZ*), l'initiation de la réplication (*hemE Ps*), la

méthylation d'ADN (*ccrM*), la biogenèse de flagelle (*fla*) et des pili (*pilA*), le chémotactisme (*che*), sa rétroactivation précoce (*ctrA* lui-même) et sa rétroinhibition tardive (*divK* et *clpP*)<sup>(Laub et al., 2002)</sup>. En somme, CtrA agit sur trois types de gènes. Les gènes impliqués dans la morphogenèse polaire, ceux mêlés aux processus du cycle cellulaire, et ceux engagés eux-mêmes dans une régulation. Remarquons que pas moins d'un quart des gènes régulés au cours du cycle cellulaire sont sous contrôle direct ou non de CtrA<sup>(Laub et al., 2000)</sup>.

Spécifions au passage que CtrA est identifié comme gène flagellaire de classe I. Répartis en quatre classes notées de I à IV, les gènes flagellaires sont sujets à une régulation extrêmement fine<sup>(England and Gober, 2001)</sup>. La classe I est uniquement composée par *ctrA* dont le produit va activer la transcription des gènes de classe II. Leur assemblage correct en membrane interne est signalé à la cellule qui lance alors la transcription de la classe III. Identiquement, l'assemblage adéquat de ces composants protéiques dans le périplasme et en membrane externe renseigne la cellule qui déclenche l'expression de la classe IV constituée essentiellement des gènes encodant le filament flagellaire.

## Régulation et régulateur

Plusieurs études décrivent la variation du taux de CtrA actif au cours du cycle asymétrique de *Caulobacter* (Fig. 11). Présent en grande quantité dans la cellule flagellée, CtrA disparaît intégralement pendant la transition G1-S, semble-t-il pour permettre l'initiation de la réplication. Aussitôt l'initiation déclenchée, CtrA est resynthétisé bloquant de ce fait toute nouvelle initiation. Culminant durant la progression en phase prédivisionnelle jusqu'à la complétude du septum, sa concentration chute derechef dans la cellule fille stalkée tandis qu'elle est maintenue élevée dans la cellule fille flagellée<sup>(Quon et al., 1996)</sup>. Ajoutons que CtrA se localise au pôle pourvu ou anciennement pourvu d'une organelle précisément avant sa disparition inexorable du cytoplasme<sup>(Ryan et al., 2004)</sup>.

Invariablement, ce pattern d'expression se reproduit à l'infini en conditions favorables et indique avec force l'existence d'épirégulations agissant sur l'acteur central CtrA. Trois mécanismes différents et complémentaires ont été recensés qui affectent son activité : la phosphorylation, la transcription et la protéolyse.

L'état de phosphorylation : ce système de contrôle post-traductionnel paraît évident dans la situation d'un régulateur de réponse, tout comme le fait que la greffe d'un phosphate sur le résidu D51 provoque l'activation fonctionnelle du domaine de liaison à l'ADN<sup>(Reisenauer et al., 1999, Siam and Marczynski, 2000)</sup>. Ajouté à cela, nous observons que, dans la cellule stalkée, la néotranscription de *ctrA* coïncide, avec un très léger décalage, avec la phosphorylation de son produit<sup>(Domian et al., 1997)</sup>. À ce stade, signalons la présence d'un système de signalling qui mène à la déphosphorylation de CtrA.

La régulation transcriptionnelle : CtrA est sous contrôle de deux promoteurs indépendants, P1 à activité faible et précoce, et P2 à activité forte et tardive<sup>(Domian et al., 1999)</sup>. Le mode d'activation de ces promoteurs est épatant pour sa précision, son efficacité. En début de phase S, le chromosome, et par là même P1, est méthylé sur ses deux brins. À la disparition totale de CtrA, suit l'initiation de la réplication. Le brin d'ADN néosynthétisé au niveau de la fourche de réplication est vierge de méthyle et laisse une fraction de la double hélice dans un état hémiméthylé. Le promoteur P1, contenant un site de méthylation entre la région -10 et -35, dans un état hémiméthylé permet l'atterrissage d'un facteur de transcription déclenchant la production de transcrit *ctrA*<sup>(Reisenauer and Shapiro, 2002)</sup>. L'augmentation de la quantité cytoplasmique de CtrA, non seulement inhibe une nouvelle initiation répllicative, mais surtout se fixe sur ses 55 séquences cibles identifiées, activant du même coup la production de CcrM, une DNA méthyltransférase, effectuant la méthylation de P1. De manière concomitante à la répression de P1, CtrA phosphorylé s'autoamplifie par activation de P2.

La protéolyse : cette seconde modification post-traductionnelle additionnée à la déphosphorylation fournissent deux méthodes complémentaires de contrôle sur l'activité de CtrA, un seul des deux étant capable d'assurer la perte d'activité du régulateur de réponse<sup>(Domian *et al.*, 1997)</sup>. Plusieurs facteurs cis et trans stimulent cette protéolyse : ClpXP, protéasome procaryote, en trans<sup>(Jenal and Fuchs, 1998)</sup> (rappelons que CtrA régule l'expression de ClpP), et les 56 premiers acides aminés en N-terminal ainsi que les 15 derniers résidus hydrophobes, particulièrement les deux alanines, en cis garantissent une reconnaissance spécifique, probablement par l'intermédiaire d'un autre constituant protéique (facteur trans), et un ciblage protéolytique en adéquation avec la progression du cycle cellulaire<sup>(Ryan *et al.*, 2002)</sup>. Dans cette optique, il a été prouvé que la protéolyse survenant dans la cellule fille stalkée est couplée à la formation du septum<sup>(Judd *et al.*, 2003)</sup>. Pour être tout à fait rigoureux, mieux vaut préciser que les 56 résidus du domaine N-terminal apparaissent davantage comme impliqués dans la localisation, elle-même conditionnant la protéolyse, que comme information directe à la stimulation de cette dernière<sup>(Ryan *et al.*, 2004)</sup>.

En résumé, d'un côté, l'activation par phosphorylation de CtrA est essentielle. De l'autre, des mutants de cette protéine soit résistant à la protéolyse soit constitutivement actif (non déphosphorylables) sont viables quoique d'aspect légèrement modifié contrairement au double mutant qui, lui, meurt.

## Le signalling : un nœud gordien

### Casting protéique

La découverte d'acteurs concourant à la régulation de CtrA a principalement été le résultat de deux types de manipulations expérimentales : un crible en vue de l'obtention tantôt de mutants thermosensibles (ts), tantôt de mutants cryosensibles (cs) et un test en double hybride qui consiste à révéler les interactions potentielles entre protéines.

Respectons l'ordre chronologique des recherches et commençons par le tout premier crible de mutants ts<sup>(Sommer and Newton, 1989)</sup>. Largement antérieur à l'identification de *ctrA*, ce crible avait pour finalité, l'isolation de mutants défectueux point de vue morphogénèse. Plusieurs mutations échouèrent sur un gène dénommé *pleC* en raison de la pléiotropie phénotypique affligeant la cellule. Perte d'asymétrie lors de la division, legs d'un flagelle rigide non mobile à un pôle chez chaque cellule fille, perte de chémotactisme, résistance aux bactériophages CbK, déficience pour la biogénèse des pili polaires, pour l'éjection du flagelle lors de la transition G1-S et la formation ultérieure du prostheca sont le lot des cellules placées à une température restrictive de 37°C.

Afin d'identifier les gènes coordonnant morphogénèse et scissiparité, un deuxième crible de pseudoréversion (crible cs de suppression) en surimpression à un allèle *pleC* muté a été effectué, ce qui a permis d'isoler des allèles mutés annulant les défauts de la souche parentale à haute température mais compromettant la division à basse température<sup>(Sommer and Newton, 1991)</sup>. Plus précisément, des allèles mutés de *divJ*, *divK* et *divL*, nommés de la sorte en référence à leur impact sur la division, dans un background *pleC* mutant restaurent le phénotype de mobilité à 37°C mais développent un phénotype aberrant filamenteux à 24°C. Ces allèles suppresseurs, en vue d'expérimentations ultérieures, ont été intégrés dans un background sauvage au sein duquel ils impliquent le même phénotype.

Un troisième crible suppresseur ts a été réalisé dans une souche cs pour *divK*. Présentant un phénotype sauvage à 24°C et létal à 37°C, le double mutant *divK* – *soka* (suppressor of *divK*), en réalité double mutant *divK* – *ctrA*, introduit un lien génétique entre ces différents

partenaires<sup>(Wu et al., 1998)</sup>. En outre, *sokA* supprime les phénotypes de division aberrante de *divJ* cs ainsi que ceux de perte de mobilité et d'absence de stalk de *pleC* ts.

Un dernier crible ts cité précédemment complété par une analyse circonscrite de microarrays a démontré irrévocablement la correspondance phénotypique entre mutants ts *cckA* et *ctrA* et de ce fait le lien étroit entre leur produit protéique sauvage respectif<sup>(Jacobs et al., 1999, Jacobs et al., 2003)</sup>. Notons que cette correspondance n'est pas absolue, impliquant la présence d'une fonction ne concernant pas CtrA.

Finalement, un test double hybride a apporté deux pièces supplémentaires à inclure au puzzle<sup>(Ohta and Newton, 2003)</sup>. Au-delà de DivJ et de PleC, DivK interagit physiquement avec DivL, ainsi qu'avec deux autres kinases, CckO et CckN. Néanmoins, la pertinence *in vivo* de ces résultats reste à déterminer.

## Carte d'identité, génétique et biochimie des protagonistes

**CCKA** : histidine-kinase hybride essentielle insérée en membrane interne grâce à deux segments transmembranaires du côté N-terminal, elle est liée génétiquement et phénotypiquement à CtrA en promouvant sa phosphorylation<sup>(Jacobs et al., 1999, Jacobs et al., 2003)</sup>. Pour preuve, le mutant *ctrAD51E* constitutivement actif où l'aspartate est remplacé par un glutamate, résidu à chaîne latérale plus longue, qui mime le phosphate supprime l'essentialité de CckA. Le canevas de transmission du phosphate semble posséder une Hpt encore indéterminée servant de relais entre le domaine aspartate receveur de CckA et celui de CtrA.

**DIVL** : étrange histidine-kinase sensitive composée de deux segments transmembranaires, le résidu histidine typique des histidine-kinases est substitué par une tyrosine phosphorylable. *In vitro*, DivL, dépouillé des segments transmembranaires hydrophobes, phosphoryle CtrA mais pas DivK<sup>(Wu et al., 1999)</sup>. Quelle pertinence accorder à ce résultat ? À travers les liens génétiques nous pouvons supposer que DivL agit en amont du pathway, mais dans quelle mesure ? indépendamment de DivK ?

**PLEC** : histidine-kinase typique pourvue de deux segments transmembranaires en N-terminal, PleC, nécessaire à la mobilité et au chémotactisme, agirait préférentiellement par déphosphorylation de DivK et de PleD (protéine requise pour l'éjection du flagelle), au moins de manière directe pour DivK<sup>(Wang et al., 1993, Lam et al., 2003)</sup>.

**DIVJ** : histidine-kinase à 6 régions transmembranaires partageant 48% d'identité avec PleC, DivJ, senseur putatif à signal inconnu, phosphoryle DivK et PleD. Il apparaît qu'il n'est pas la seule histidine-kinase de DivK étant donné que le mutant nul *divJ* est viable alors que le résidu aspartate de DivK est essentiel. De manière générale, DivJ est nécessaire à l'initiation de la division ainsi qu'au placement et à l'élongation du stalk<sup>(Ohta et al., 1992, Wheeler and Shapiro, 1999, Lam et al., 2003)</sup>.

**DIVK** : protéine essentielle à simple domaine RR dont la CDS est en opéron avec *pleD*, cible de PleC, DivJ et peut-être CckO et CckN, DivK semble réguler au moins la protéolyse et peut-être la déphosphorylation de CtrA apparemment avec la complicité d'intermédiaires<sup>(Hecht et al., 1995, Hung and Shapiro, 2002, Ohta and Newton, 2003)</sup>.

Remarque d'application générale concernant les histidine-kinases, leur signal non caractérisé actuellement proviendrait d'un changement interne plutôt que de conditions environnementales.

## Agencement des pièces du puzzle : les trois arcanes

Étant donné l'impossibilité stricte de générer une asymétrie ou une compartimentation subcellulaire au seul fait d'une transcription différentielle, d'un état de phosphorylation ou d'une protéolyse, l'explication réside dans la localisation, précise et ciblée, d'une protéine à un endroit de la cellule. Ajoutons cependant que cette explication ne fait que reporter le problème. Quels facteurs promeuvent la localisation ? Aucun mécanisme n'est entièrement décrit à ce sujet dans la littérature, seules des données préliminaires sont disponibles<sup>(Rudner *et al.*, 2002)</sup>. Néanmoins, nous pouvons imaginer l'alternative suivante :

- Soit ce facteur est protéique et participe à la localisation d'une autre protéine en tant qu'ancrage, elle-même localisée, ou en tant qu'activateur d'une protéolyse différentielle. À nouveau, ces deux cas ne font que postposer la question du comment.
- Soit ce facteur est un constituant bactérien polaire interne tel la paroi ou la membrane. En effet, nous pouvons aisément spéculer une distinction polaire occasionnée par une synthèse septale du peptidoglycan dont la composition diffère de celle du reste de la paroi<sup>(Skerker and Laub, 2004)</sup>. Cette génération d'information spatiale voire temporelle fournit une excellente prémisse à la localisation protéique.

### FILIÈRE 1 : CckA

La concentration de cette histidine-kinase hybride inféodée à la membrane interne ne subit pas de variation significative au cours du cycle cellulaire. Par contre, la protéine oscille entre une distribution diffuse et une autre positionnée selon l'étape du cycle<sup>(Jacobs *et al.*, 1999)</sup>. Dans la cellule flagellée aussi bien que dans la cellule stalkée, CckA se retrouve dispersé en membrane. Une situation identique survient dans la cellule en transition à ceci près que la distribution est hétérogène, que CckA semble s'accumuler à certains points. Opposé à cet état, la cellule prédivisionnelle précoce, après l'initiation de la réplication, acquiert le signal permettant la localisation de CckA au pôle opposé au prostheca. Plus tard, toujours dans la cellule prédivisionnelle, ultérieurement à la formation du flagelle, CckA localise concomitamment au pôle stalké et néoflagellé avec une intensité plus faible pour le pôle stalké. Suite à la constriction septale, CckA réinvestit son état diffus (Fig. 12). Le domaine responsable de cette oscillation positionnelle est en fait le domaine contenant les segments transmembranaires. Ce qui est remarquable, c'est la corrélation quasi parfaite entre la localisation de CckA à un pôle et la synthèse (ainsi que l'activation par phosphorylation) de CtrA.

Ajoutons que, outre ses domaines histidine-kinase et aspartate receveur, CckA paraît nécessiter une dimérisation, qui ne requiert pas les domaines transmembranaires, pour exercer son activité.

### FILIÈRE 2 : DivL

À ce jour, aucune expérience *in vivo* sur DivL n'a été produite laissant un voile sur une fraction du système. La nature essentielle de la tyrosine phosphorylable et les liens génétiques unissant DivL au reste des acteurs sont des données minces pour une compréhension globale du pathway. To be continued...

### FILIÈRE 3 : LE MULTICOMPOSANT PLE-C-DIVJ-DIVK

DivJ et PleC sont deux protéines antagonistes tant au niveau de leur activité sur DivK que sur leur distribution asymétrique. Alors que la première est continuellement localisée au pôle stalké et diffuse en membrane dans les types cellulaires qui n'en possèdent pas, PleC s'insère en membrane au niveau du pôle flagellé que le flagelle soit mobile ou non (Fig. 13). D'ailleurs, la localisation subcellulaire de ces deux marqueurs d'organelles polaires, DivJ pour la prostheca et PleC pour le flagelle, n'est pas à l'origine de la biogenèse de l'organelle mais est son corollaire. En effet, un délétant - perte de fonction de la protéine - de l'un des

deux marqueurs n'entraîne pas la disparition de l'organelle auquel il est affecté. Au contraire, il induit l'absence de la seconde organelle et son remplacement par le premier (toujours dans le cas de *pleC::Tn5* et parfois dans le cas de  $\Delta divJ$ )<sup>(Wheeler and Shapiro, 1999)</sup>.

À l'instar du principe de localisation de CckA, ce sont les portions transmembranaires des deux kinases qui sont seules aptes à décoder l'information spatiale nécessaire à leur positionnement à l'endroit *ad hoc*. Dans cette optique, nous le savons pour DivJ, le résidu histidine phosphorylable ne conditionne aucunement un processus de localisation<sup>(Lam et al., 2003)</sup>.

En lien génétique a été mis en évidence entre *divJ* et *pleC*. Le double mutant *divJ* ; *pleC::Tn5* subit des phénotypes similaires à ceux présents chez le simple mutant *divJ::Gen* et non ceux présents chez le simple mutant *pleC::Tn5* et la sauvage. *divJ* est donc épistatique sur *pleC*<sup>(Wheeler and Shapiro, 1999)</sup>.

En ce qui concerne DivK, sa localisation respecte, avec une légère variante, un canevas étroitement lié à celui de DivJ<sup>(Jacobs et al., 2001)</sup>. Dispersé dans le cytoplasme d'une cellule flagellée, DivK se localise au pôle stalké aussitôt la transition G1-S effectuée. Dans la cellule prédivisionnelle, tout en restant au pôle stalké, une faible fraction s'accroche au pôle néoflagellé. Les deux emplacements polaires opposés demeureront occupés jusqu'à l'achèvement de la septation, étape après laquelle DivK sera relâché du pôle flagellé (Fig. 14). Sans véritablement varier point de vue transcription et concentration cytoplasmique, DivK, au même titre que PleC et DivJ, jouit d'une localisation dynamique. Spécifions que, contrairement aux histidine-kinases, DivK acquiert un positionnement adéquat suite à la phosphorylation de son résidu aspartate<sup>(Lam et al., 2003)</sup>.

Essentiellement deux indices, couplés à l'entière des éléments exposés ci-dessus concernant le ménage à trois PleC, DivJ et DivK, nous autorise à échafauder un modèle dynamique mettant en exergue la bipolarisation de DivK (C. Jacobs-Wagner, communication personnelle). Tout d'abord, un délétant pour *divJ* est strictement incapable de localiser DivK, quel que soit le type cellulaire. À l'inverse, un mutant *pleC::Tn5* est, lui, déficient pour le relargage de DivK au pôle néoflagellé<sup>(Jacobs et al., 2001, Lam et al., 2003)</sup>. Le modèle - sorte de « ping-pong » protéique -, quant à lui, s'opère en trois temps (Fig. 15) :

- I. Suite à la transition G1-S, DivJ s'insère de manière définitive au pôle stalké et acquiert son activité kinasique maximale sur DivK. Ce dernier, présent en quantité faible sous sa forme phosphorylée dans la cellule flagellée, suite à sa phosphorylation par DivJ, colocalise avec lui. Le taux de DivK phosphorylé croissant au pôle stalké, une proportion, minime dans un premier temps, puis grandissante, du régulateur de réponse activé est délesté dans le cytoplasme établissant un gradient jusqu'au pôle néoflagellé.
- II. Passé un certain seuil, DivK~P s'accumule également au pôle flagellé. À cet instant, le jeu incessant de ping-pong s'instaure. DivJ lâche, du pôle stalké, un DivK phosphorylé qui migre vers le pôle néoflagellé où PleC s'empresse de le larguer, inactivé par déphosphorylation.
- III. Cette mise en scène persiste, attendant une septation définitive. En effet, conséquemment à la séparation des deux cytoplasmes, la cellule fille stalkée, faute de phosphatase, accumule DivK sous forme phosphorylée engageant d'une manière ou d'une autre la protéolyse de CtrA et la relance d'un cycle réplcatif chromosomique. Inversement, la cellule fille flagellée, privée d'une histidine-kinase, voit son pool de DivK~P s'amenuiser drastiquement, avec comme implication la stabilisation de CtrA et donc l'hibernation de la réplication.

Une question s'impose incontinent : pourquoi une telle espièglerie moléculaire ? L'hypothèse la plus solide et la plus judicieuse consiste à présumer ce mécanisme comme étant de nature à sentir la complétude de la division. Cependant, l'explication ne peut se

limiter à cela. En surimpression, il semblerait que la localisation de DivK~P au pôle néoflagellé de la cellule prédivisionnelle contrecarre la mobilité du flagelle. La raison ? éviter les lésions membranes et pariétales dues au travail déployé par un flagelle actif ? Est-ce l'unique fonction assurée par DivK au pôle flagellé ? Qui sait ?

Avant de clore cette partie traitant du signalling, plusieurs observations sont à récapituler :

- Si nous assimilons CtrA à un goulot d'étranglement qui décidera de dispatcher ou non une réponse globale, la cascade de signalling fonctionne véritablement comme un entonnoir collectant les informations nécessaires au bon déroulement du cycle cellulaire pour ensuite les transmettre au nœud central.
- L'activité des kinases paraît émaner, d'une manière ou d'une autre (éventuellement par un effet de concentration qui affecte positivement la constante d'équilibre ou l'équilibre en tant que tel), de leur localisation bien qu'activité et localisation soient discernables d'un point de vue moléculaire.
- Les fondements de l'asymétrie et du dimorphisme cellulaire reposent clairement sur une distribution protéique asymétrique, quelle qu'en soit l'origine.
- La localisation semble s'opérer suite à la terminaison d'un événement de différenciation. Sans m'aventurer trop avant sur ce point, je sou mets cette observation : ce n'est pas l'élongation du prostheca mais l'achèvement d'étapes de transition G1-S qui incite DivJ à se localiser.
- Suite à l'édification du modèle « ping-pong », il est aisé d'expliquer l'épistasie de DivJ sur PleC. Dans le cas où la kinase (DivJ) ne remplit pas sa fonction de phosphorylation sur DivK, ce dernier ne peut s'accumuler dans le cytoplasme sous forme active empêchant par cette occasion la localisation au pôle néoflagellé. En l'absence de DivK~P, PleC, phosphatase en mal de substrat, perd sa principale raison d'être : déphosphoryler.

## Information positionnelle et échafaudage moléculaire

Un pas supplémentaire a été franchi dans le champ d'investigation des processus de localisation lors de l'identification d'une protéine nécessaire à une distribution exacte de PleC<sup>(Crymes *et al.*, 1999, Viollier *et al.*, 2002, Hinz *et al.*, 2003, Smith *et al.*, 2003)</sup>. Dénommé PodJ pour polar organelle development, ce « localiseur » ne possède aucune caractéristique des protéines appartenant au système à deux composants. Outre sa capacité d'induire la localisation d'une tierce protéine (CpaE) impliquée dans la biogenèse des pili (fonction auxiliaire de PleC), il présente un pattern d'expression quelque peu singulier (Fig. 16). PodJ<sub>L</sub> – forme longue- s'accumule en membrane au pôle flagellé de la cellule prédivisionnelle précoce suite à l'augmentation de transcription du gène *podJ*. Dans la cellule prédivisionnelle tardive, il est processé au fur et à mesure et perd, par protéolyse, son segment transmembranaire C-terminal pour devenir PodJ<sub>S</sub>, ce dernier exhibant une proportion membrane/cytoplasme de 50-50. Suite à la formation du septum, la cellule fille stalkée réinitie un cycle et accumule à nouveau PodJ<sub>L</sub> au pôle néoflagellé tandis que la cellule fille flagellée garde PodJ<sub>S</sub> au pôle flagellé jusqu'à la fin de la transition G1-S.

En vertu de sa faible similarité de séquence avec les peptidoglycan-binding domains, PodJ nous apparaît soit comme un intermédiaire additionnel du véritable localiseur au sommet de la hiérarchie, soit comme cet ultime localiseur interagissant avec un constituant pariétal inhabituel et localisé. Néanmoins, un domaine coiled-coils typique des interactions homoprotéiques ainsi qu'un tetratricopeptide repeat motif (TRP) qui conditionne des



interactions hétéroprotéiques ont été identifiés au sein de la séquence de PodJ suggérant une fonction d'échafaudage protéique pour une série d'acteurs de morphogenèse polaire et d'asymétrie cellulaire. Ce concept est bien connu pour des phénomènes de transduction du signal chez les eucaryotes. En effet, l'échafaudage moléculaire insère la notion de spécificité dans la connexion des diverses protéines appartenant à la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase), de leurs activateurs, les MAPK kinases ou MEK, et des activateurs des MEK, les MAPKKK<sup>(Kyriakis and Avruch, 2001, Morrison and Davis, 2003)</sup>. Pareillement, PodJ serait en mesure d'introduire cette notion dans un système à deux composants qui se révèle quelquefois peu spécifique. Pour illustrer cette assertion, il est à signaler la transmission artéfactuelle *in vitro*, du phosphate de  $c_c\text{DivJ}$  à  $c_c\text{CtrA}$ <sup>(Wu *et al.*, 1998)</sup>.

Considérons à présent le localiseur de DivK. Il serait cohérent d'accorder à DivJ et/ou à PleC le titre d'information positionnelle avisant leur régulateur de réponse de la distribution spatiale à adopter. Cette hypothèse, dans la mesure où elle serait exacte, ne saurait être que temporaire. La délocalisation persistante soit de DivJ, soit de PleC n'affecte en rien l'état localisé de DivK, bien que ce dernier localise à un endroit inapproprié<sup>(Wheeler and Shapiro, 1999, Jacobs *et al.*, 2001)</sup>. En fait, DivJ, dont la délétion aboutit à la délocalisation totale de DivK, apparaît plutôt comme une sorte de « trappeur » qui harponne sa proie - DivK - pour la relâcher, active, au localiseur propre de DivK.

## Transpositions et extensions systémiques

J'insiste à nouveau sur le fait que ce portrait de *Caulobacter* dans le cadre de ce mémoire, n'a d'autre but que d'ébaucher des pistes menant à la dissection complète du pathway de CtrA chez *Brucella*. De surcroît, je répète que la transposition n'est en aucun cas une simple et superflue vérification et que, sans une preuve tangible, aucune conclusion ne doit être tirée à propos de *Brucella* sur la seule base du paradigme *Caulobacter*. N'oublions pas aussi que *Caulobacter* est un piètre modèle vis-à-vis de l'objectif ultime de la recherche sur *Brucella*, à savoir l'étude des mécanismes de virulence.

### Atavisme familial

Jusqu'à présent, tout concourt à écarter ces deux bactéries aux modes de vie largement distincts et donc à endiguer une quelconque transposition. Rien n'est moins sûr.

- Primo, l'asymétrie, incontestable chez *Caulobacter*, est une caractéristique inhérente, quoique plus effacée, à la multiplication de *Brucella*. En effet, au départ d'une cellule mère, deux cellules filles morphologiquement différentes sont produites suivant une distribution invariable : une petite bactérie accompagnée d'une grande (Fig. 17). Ce dimorphisme minime explique pour quelles raisons *Brucella* a longtemps été considérée comme se divisant symétriquement (R. Hallez *et al.*, sous presse 2004).
- Secundo, la bactérie n'est pas dépourvue d'organelle, elle possède un flagelle gainé en bonne et due forme (J. Ferroz, thèse en cours). Maintes analyses *in silico* subdoraient déjà l'existence de cette organelle en raison de la présence, parmi les génomes des diverses espèces de *Brucella*, de plus d'une trentaine de gènes flagellaires requis pour la plupart lors du cycle infectieux. Un embarras subsistait. Les gènes *motA*, *motB*, *motC* mis à part, aucun des gènes responsables du chémotactisme n'y figuraient. Sans système

de guidage, la bactérie flagellée est condamnée à foncer droit devant elle sans direction privilégiée. Signalons au passage qu'il a été décrit chez *Salmonella typhimurium* que la perte du chémotactisme entraîne un accroissement de virulence à travers, spéculent les auteurs, une dissémination nettement plus étendue<sup>(Jones et al., 1992)</sup>.

- Tertio, comme il a déjà été précisé précédemment, *Brucella* bloque temporairement, et semble-t-il activement, sa réplication lors des prémices du trafic vacuolaire. De là à spéculer que CtrA est le régulateur responsable de cette réponse, à l'instar du mécanisme décrit chez *Caulobacter*, il n'y a qu'un pas rapidement franchi. Reste à tester cette hypothèse.
- Quarto, la conservation structurale et fonctionnelle entre les deux homologues CtrA dans chaque genre est extrêmement élevée. L'implication de  $_{Br}CtrA$  dans le cycle cellulaire, son identité par rapport à son homologue chez *Caulobacter* atteignant quatre-vingt-un pourcents, son domaine N-terminal régulateur de réponse phosphorylable sur un résidu aspartate, son domaine C-terminal typique des domaines de liaison à l'ADN dont la boîte nucléotidique consensus est quasi identique à celle de *Caulobacter*, sa capacité accrue à lier l'ADN dans son état phosphorylé, tous ces éléments convergent vers l'hypothèse d'une conservation de la fonction primaire de  $_{Cc}CtrA$  chez *Brucella*.
- Quinto, le pathway de signalisation qui avertit CtrA de la marche à suivre se trouve relativement bien conservé entre les deux genres (thèse A.-F. Bellefontaine, 2001). Les trois gènes impliqués dans la scissiparité, *divJ*, *divK* et *divL* ainsi que les gènes encodant les kinases *pleC* et *cckA*, vu leur présence dans le génome de *Brucella*, renforce l'hypothèse, sans la confirmer, d'une transmission d'informations similaire et aisément transposable d'une espèce à l'autre.

## Variations fondamentales (thèse A.-F. Bellefontaine)

Étant donné le schisme radical quant aux préférences environnementales de *Brucella* et *Caulobacter*, il serait tout à fait conséquent que les réponses globales de la cellule soient spécifiques et, de ce fait distinctes, selon l'espèce afin d'engendrer un comportement *ad hoc*. Que ces réponses soient transmises par des mécanismes remarquablement conservés au cours de l'évolution ne change rien à la donne. C'est donc avec cohérence que cette hypothèse se voit vérifiée en ce qui concerne les gènes cibles de CtrA. À l'exception de *ccrM*, on subodore que CtrA régule la division par le truchement d'autres gènes tels *ftsK* et *ftsE* ainsi que par un opéron (*minB*) composé des gènes *minC*, *minD* et *minE* absents du génome de *Caulobacter*. Le gène *minC* encode la protéine inhibitrice de FtsZ, acteur primordial de l'anneau de septation ou anneau Z et ubiquiste dans le monde procaryote. L'action véritable de MinC, bien étudiée chez *E. coli*<sup>(Margolin, 2000)</sup>, dispose le septum au niveau du plan médian de la cellule (position canonique) par inhibition polaire systématique d'anneaux ectopiques, et ce grâce à un jeu de va-et-vient continu entre les deux pôles. Précisément, c'est l'absence de MinC sur le plan médian, parce que réquisitionné aux pôles, qui sollicite la localisation adéquate de FtsZ. En bref, au lieu de réguler directement l'expression de *ftsZ*, comme démontré chez *Caulobacter*,  $_{Br}CtrA$  influence, via quatre sites de liaison, la transcription de son inhibiteur, semble-t-il négativement. Cette constatation, additionnée au fait que la concentration de CtrA augmente parallèlement à celle de FtsZ (corrélation inverse par rapport au cas *Caulobacter*), insinue l'idée d'une mécanique septale propre aux deux espèces.

Deux divergences, plus surprenantes, concernent le pattern de rétroaction de CtrA. Tout d'abord, son propre promoteur ne contient pas deux mais trois consensus de liaison pour CtrA dont deux semblent fonctionner comme activateurs de transcription et le troisième comme

répresseur. Ensuite, CtrA est capable de lier le promoteur de *pleC*, *divJ*, *divL* et *pdhS* (du moins, c'est une prédiction pour les promoteurs de *divJ*, *divL* et *pdhS*) sans plus savoir le faire pour ceux de *divK* et *clpP*.

Parmi toutes ces dissimilitudes, l'une d'elles revêt une importance considérable, vu sa place à l'intérieur du pathway amont de CtrA. La protéine PdhS, pour PleC/DivJ homologous sensor, est une histidine-kinase et/ou phosphatase putative de DivK. Son intérêt réside dans l'absence d'orthologue chez *Caulobacter*. Remarquons qu'il en existe au moins un chez *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens*. À l'inverse, les partenaires putatifs de DivK, CckO et CckN, semblent inexistantes chez *Brucella*.

## Données complémentaires chez *B. abortus* (R. Hallez, thèse en cours)

Un test double hybride restreint aux acteurs du pathway amont a confirmé les interactions présumées entre DivK et ses histidine-kinases putatives (PleC, DivJ et PdhS) ainsi que l'interaction entre DivK et DivL sans mettre en lumière d'interactions supplémentaires entre les divers partenaires.

Les protéines CtrA, CckA et PdhS sont exprimées dans une population de bactéries non synchronisée cultivée en milieu liquide, en dehors de tout contact avec des cellules hôtes. Les tests sur DivK et PleC sont en cours.

La surexpression des divers protagonistes du pathway amont conduit à des phénotypes de deux types (Fig. 18). La surexpression de DivJ induit la filamentation de la cellule, signe potentiel d'une inhibition de la septation. Le second phénotype, provoqué par surexpression de DivK, CtrA, CckA, PleC, DivL et PdhS, est visualisé sous forme de bactéries triadiques.

## *Sinorhizobium meliloti*, un tremplin pour *Brucella*

Du fait de sa parenté étroite avec *Brucella*, confrontée à celle plus distante de *Caulobacter*, *S. meliloti* s'avère être un allié considérable en vue d'une meilleure appréhension du système chez *Brucella*. Rares sont les données disponibles sur ce symbionte de plante au sujet de CtrA, néanmoins l'une d'elles se révèle être particulièrement captivante<sup>(Lam et al., 2003)</sup>. DivK, empreint de son essentialité, se localise uniquement au pôle opposé au pôle anciennement constitué par le septum et ce dans la cellule prédivisionnelle précoce, et est délocalisé, suite à la septation, dans la petite cellule néoformée, contrairement au cas de la grande cellule néoformée (Fig. 19). Sachant que le schéma de division de *S. meliloti* comporte les mêmes aspects que celui de *Brucella*, notamment une asymétrie discrète, le canevas de localisation de DivK est susceptible de correspondre étroitement à celui présent chez *Brucella*.

En outre, ce mode de fonctionnement semble souligner, par l'absence d'organelles polaires, que celles-ci n'instituent en rien un prérequis, un fondement aboutissant à l'instauration d'une asymétrie ou tout au moins d'une distribution asymétrique.

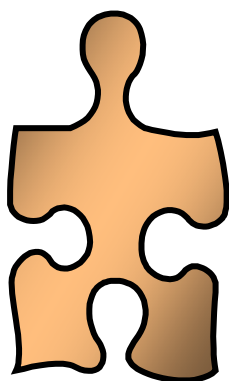
## Objet du mémoire

À travers tout ce qui a été exposé, deux maîtres mots s'imposent logiquement : virulence et différenciation. C'est donc tout naturellement que les objectifs de ce travail se penchent vers ces deux aspects dont les processus moléculaires restent, pour une large part, à élucider.

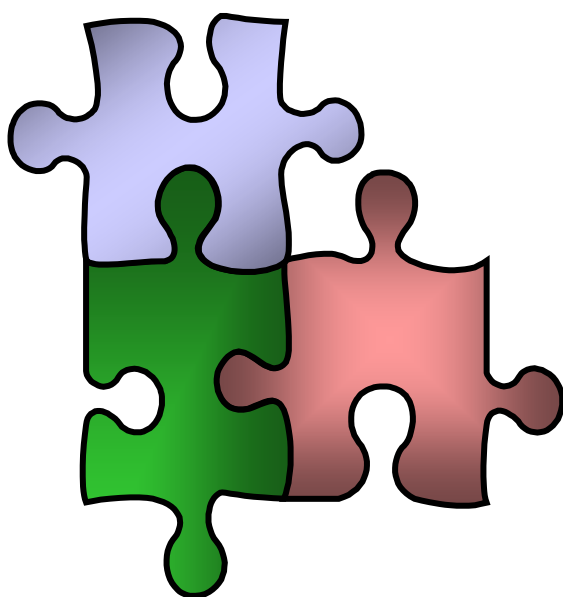
Dans un premier temps, il sera intéressant de se diriger vers et de décortiquer les mécanismes moléculaires qui régissent le dimorphisme voilé et l'asymétrie cellulaire supputée à l'aide d'outils génétiques (mutants) ou d'étiquettes fluorescentes (fusions traductionnelles et niveaux d'expression). Dans cette optique, se focaliser sur le rôle et les propriétés de PdhS apparaît comme l'approche la plus instructive. Tout d'abord parce que le paradigme *Caulobacter* n'est pas en mesure de nous renseigner le moins du monde sur ce point. En outre, la portée de cette approche risque, à long terme, d'éclairer les fondements de la divergence évolutive au sein des  $\alpha$ -protéobactéries.

La phase subséquente consistera à assimiler les divers résultats, sans omettre l'intégration de paramètres novateurs tels que PdhS, afin d'ébaucher une trame du pathway amont de CtrA, de la confronter aux modèles élaborés chez *C. crescentus* et *S. meliloti*, d'en recenser les similitudes et écarts.


Pour clore définitivement cette partie introductive, il nous restera à replacer, dans la mesure du possible, toute ébauche de canevas dans un contexte de virulence. Cette étape consistera à examiner l'impact de chaque acteur pris séparément sur le potentiel infectieux, ou plutôt consistera à examiner l'impact de l'absence de cet acteur.



# Résultats et discussions



# Résultats et discussions

outes les expériences réalisées dans le cadre de ce mémoire ont pour finalité une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans l'espèce bactérienne *Brucella abortus*. Cette option est en réalité un choix figé qui comporte néanmoins deux légers avantages : rapportés à ces cousines phylogéniques, le caractère virulent de *B. abortus* chez l'humain est moins prononcé et son taux de croissance est plus élevé. Bien que la transposition sans vérification soit erronée en théorie, celle existant entre les espèces du genre *Brucella* est implicite et ne requiert pas d'expérimentations supplémentaires en ce qui concerne les divers acteurs du pathway amont de CtrA vu leur conservation quasi parfaite.

D'un point de vue purement pratique, essentiellement trois approches seront envisagées qui participeront à la dissection systématique du réseau de régulation CtrA :

1. La première manipulation abordera de manière qualitative l'activité transcriptionnelle grâce à la construction plasmidique d'une fusion entre le promoteur de chaque gène d'intérêt et la *gfp*, gène encodant une protéine fluorescente dans des longueurs d'onde correspondant au vert.
2. La deuxième tentera d'élucider les concepts de localisation (présumée) asymétrique via la construction de vecteurs exprimant des fusions traductionnelles entre protéine d'intérêt et GFP qui nous permettront de visualiser et de pister, soit sur une population désynchronisée, soit au cours d'un time lapse - véritable film indiquant la progression du cycle cellulaire et la distribution d'une ou de plusieurs protéines -, de l'acteur protéique désiré qu'il soit disposé dans un contexte sauvage ou non.
3. Enfin, la dernière manipulation se basera sur un remaniement génomique de souches sauvages. L'obtention de mutants pour les différents gènes d'intérêt, couplées aux fusions traductionnelles susmentionnées, ouvrira le champ à l'assimilation des liens génétiques complexes rassemblant les protagonistes entre eux.

## Fusions promoteur - *gfp*

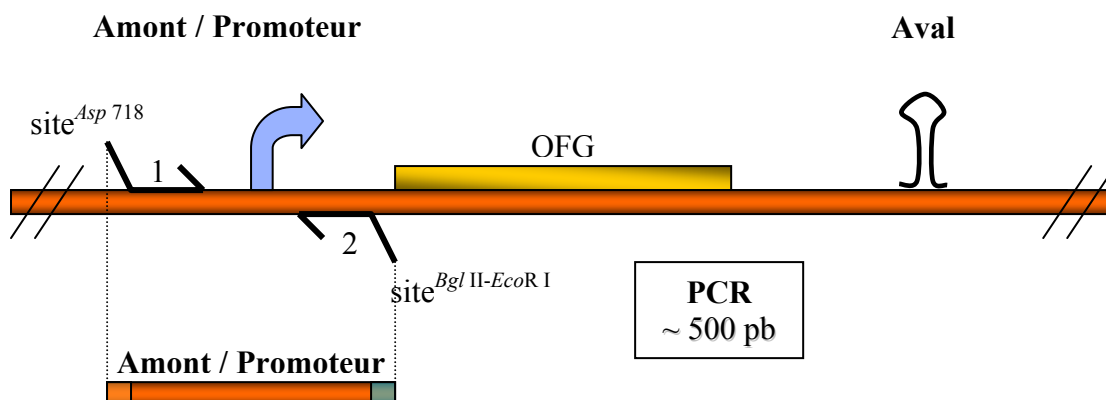
Cette approche n'a d'autre but que d'apporter un renseignement sur les activités transcriptionnelles et absolument pas sur leur spatialité ni leur intensité. Il faut entendre par là que le facteur visualisable dans cette manipulation n'a pas la prétention de dépasser une information sommaire de type promoteur éteint, faiblement activé ou fortement activé, sans plus. En effet, la GFP utilisée dans cette manipulation est trop stable que pour indiquer un changement quantitatif ou suivre instantanément la progression du taux d'activité du promoteur. Remarquons qu'un test  $\beta$ -gal (fusion du promoteur d'intérêt avec la CDS de *lacZ* codant la  $\beta$ -galactosidase dont la concentration cytoplasmique est calculée en fonction du taux de métabolisation de son substrat artificiel, le X-gal) serait nettement plus approprié dans une optique quantitative. Cependant, cette fusion *lacZ* n'a pas grand intérêt dans le cas qui nous occupe car elle rend compte d'un effet global et masque l'existence de sous-populations distinctes. La fluorescence, quant à elle, accorde une individualisation des bactéries dans un contexte asynchrone. En outre, elle octroie l'étude d'activité du promoteur en conditions *ex vivo*, condition dans laquelle la cellule hôte infectée se retrouve isolée de son environnement systémique.

Cinq gènes du pathway CtrA amont sont désignés pour tester leur activité transcriptionnelle, à savoir *divJ*, *divK*, *divL*, *pdhS* et *pleC*. Assurément, notre choix s'appuie sur plusieurs faits. La donnée novatrice par rapport au modèle *Caulobacter* est l'intégration d'une histidine-kinase supplémentaire, PdhS, homologue de DivJ et de PleC. Comme il a été cité dans l'introduction, une expérience de double hybride réalisée au laboratoire a mis en évidence l'interaction de DivK avec cette histidine-kinase ainsi qu'avec DivJ, DivL et PleC. Un second raisonnement nous a menés à écarter de l'étude CtrA lui-même et CckA. Les résultats en western blot indiquent une expression de ces deux protéines (ainsi que de PdhS) dans une population désynchronisée tandis que DivJ et DivL sont indétectables malgré l'obtention d'anticorps les reconnaissant correctement. Quant aux cas de DivK et PleC, l'étude d'immunodétection est toujours en cours.

## Construction de l'outil plasmidique

L'élaboration du vecteur indispensable à la réalisation de cette expérimentation s'effectue en deux temps :

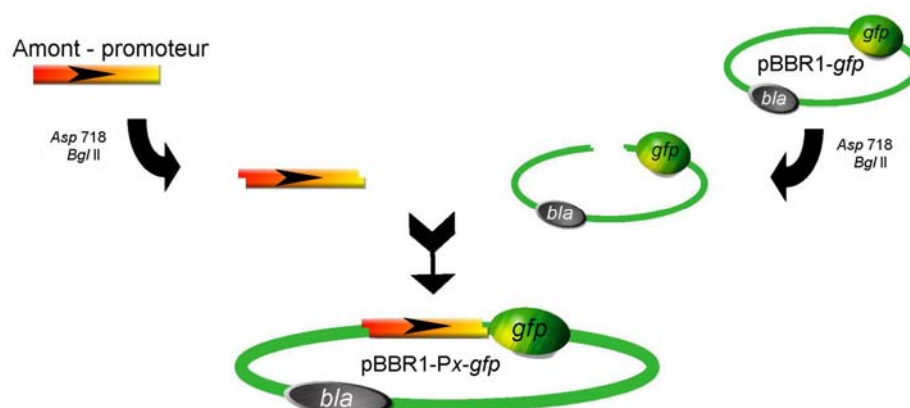
1. Tout d'abord, il est nécessaire d'amplifier un fragment correspondant au promoteur présumé du gène, en d'autres termes, nous amplifions la partie en amont du codon d'initiation de la traduction prédit (Fig. 1). Typiquement, nous concevons une paire d'amorces délimitant approximativement 500 paires de bases (pb). Ces amorces portent, sur leur extrémité 3', 20 bases capables de former des interactions du type Watson-Crick avec une région spécifique dans la région promotrice, comme représenté sur la figure apparentée. Sur leur extrémité 5', par contre, les amorces forward (n°1) et reverse (n°2) arborent respectivement un site de restriction à l'enzyme *Asp* 718 et deux sites de restriction aux enzymes *Bgl* II et *EcoR* I. Aux parties amont conçues de la sorte, nous attribuons pour le reste de l'exposé les dénominations de *PdivJ*, *PdivK*, *PdivL*, *PpdhS* et *PpleC* respectivement pour les gènes *divJ*, *divK*, *divL*, *pdhS* et *pleC*.



**Fig. 1.** Amplification de la région amont des gènes d'intérêt (OFG).

2. Après la purification des produits PCR et leur analyse en gel d'agarose (électrophorèse), nous restreignons les fragments amont avec *Asp* 718 et *Bgl* II. Cette étape permet, par la suite, d'opérer un clonage directionnel dans le vecteur de destination, le pBBR1-*gfp*, restreint par les mêmes enzymes. Ces deux produits de restriction, suite à leur purification, sont mis en présence dans un rapport moléculaire insert/matrice de 1/1 (Fig. 2). Une telle concentration équimolaire diminue les risques d'insertion multiple (rapport > 1).

Ensuite, la construction finale est validée à l'aide du séquençage du fragment cloné. Celui-ci étant censé être un lieu de reconnaissance pour un ou plusieurs facteurs de transcription, aucune mutation n'a été tolérée. En réalité, à cause d'une quantité plasmidique de départ trop faible, le séquençage a dû être réalisé sur un fragment amplifié par PCR via l'amorce *igfp*, s'hybridant sur la séquence codante du gène *gfp* et l'amorce n°1. Cette étape supplémentaire ne change en rien la situation, la probabilité que survienne une mutation ponctuelle révertante en début de PCR frôlant zéro.



**Fig. 2.** Introduction du produit PCR amont dans le pBBR1-*gfp*

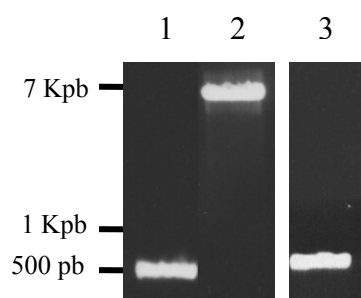
La dernière action à effectuer avant la partie test proprement dite consiste en l'introduction du vecteur recombinant dans *B. abortus*. La technique choisie préférentiellement pour atteindre cet objectif consiste à faire conjuguer la souche receveuse, en l'occurrence *B. abortus*, avec une souche donneuse, en l'occurrence *E. coli* S17-1, préalablement transformée avec le plasmide d'intérêt. Ce cas de figure n'est envisageable que si la souche expéditrice et le plasmide sont prévus à cet effet, c'est-à-dire s'ils contiennent respectivement des gènes



mobilisateurs et une origine de transfert (*oriT*) promouvant tous deux le transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre. Sur *Brucella*, nous réalisons des PCR diagnostique sur colonies pour vérifier le transfert des différents plasmides (Fig. 3).

Afin d'éprouver le type de construction présenté ci-dessus, nous restreignons le plasmide et visualisons les produits PCR sur gel d'agarose (Fig. 3). Étant donné les faibles variations entre les cinq constructions, nous renseignons uniquement le cas du promoteur de *pleC*.

n°	Produit PCR/plasmide	Restriction en :	Amorces	Profil attendu
1	PCR <i>pleC</i> amont	-	Forward - reverse	526 pb
2	pBBRI- <i>gfp</i>	<i>Asp</i> 718/ <i>Bgl</i> II	-	6634 pb      64 pb
3	PCR <i>pleC</i> sur colonies	-	Forward - <i>igfp</i>	663 pb



**Fig. 3.** Électrophorèse en gel d'agarose 1% de la construction restreinte comme indiqué ci-dessus et des deux produits PCR. A gauche, l'échelle de tailles. Pistes : 1, PCR *pleC* amont ; 2, pBBRI-*gfp* ; 3, PCR sur colonies *PpleC*.

## Activité des promoteurs en milieu liquide

On pourrait croire cette expérience facultative et donc peu pertinente étant donné le caractère pathogène de *Brucella*. Néanmoins, je rappelle que *Brucella* n'est pas un parasite intracellulaire obligatoire, dès lors une infection eucaryote n'exprime qu'une partie de son cycle de vie, l'autre partie, non négligeable, se déroulant sous une forme libre dans la nature.

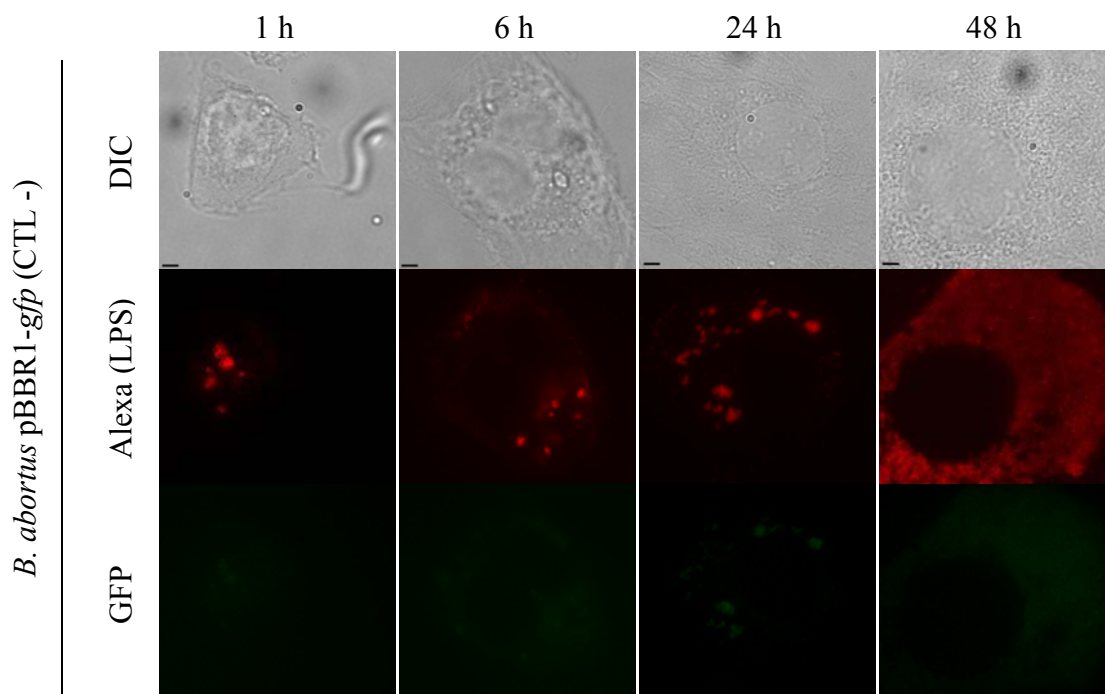
La démarche opérationnelle est la suivante : la veille en soirée, nous inoculons six précultures liquides de *B. abortus*, cinq possédant chacune une construction différente et une sixième possédant le vecteur dépourvu de promoteur qui nous servira de contrôle négatif, dans un milieu riche (2YT) additionnée d'antibiotiques adéquats (Nal25 Amp100). Cette sélection favorisera les souches de *B. abortus* Nal<sup>R</sup> munies du plasmide. Dans la matinée, nous diluons ces six cultures en prenant soin de les amener à une DO<sup>600</sup> d'environ 0,05. L'après-midi même, le lendemain matin et après-midi ainsi que le surlendemain matin, nous prélevons une quantité invariable de chaque culture, la fixons au paraformaldéhyde (PFA) 4% pour ensuite immobiliser les bactéries sur coverslip, les marquer via un anticorps dirigé contre le LPS de *Brucella* et finalement les observer sous microscope à épifluorescence (voir Marquage immunocytochimique, page 66).

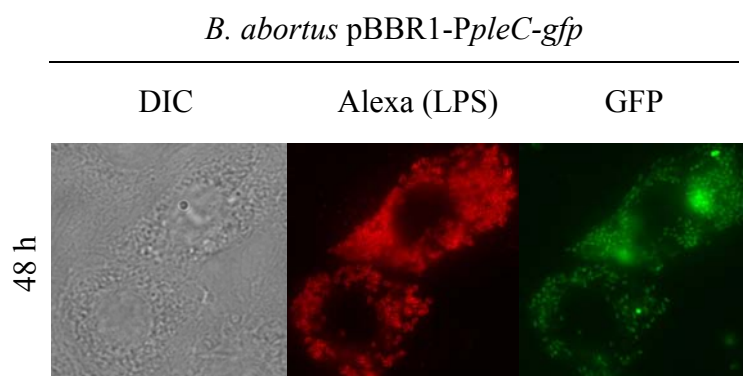
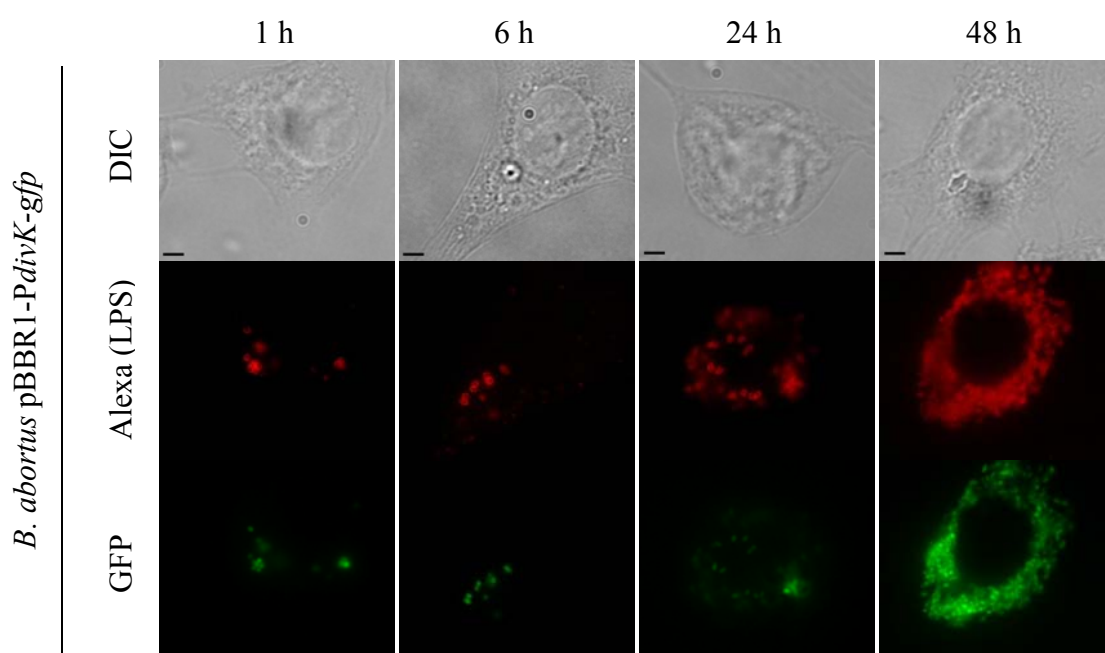
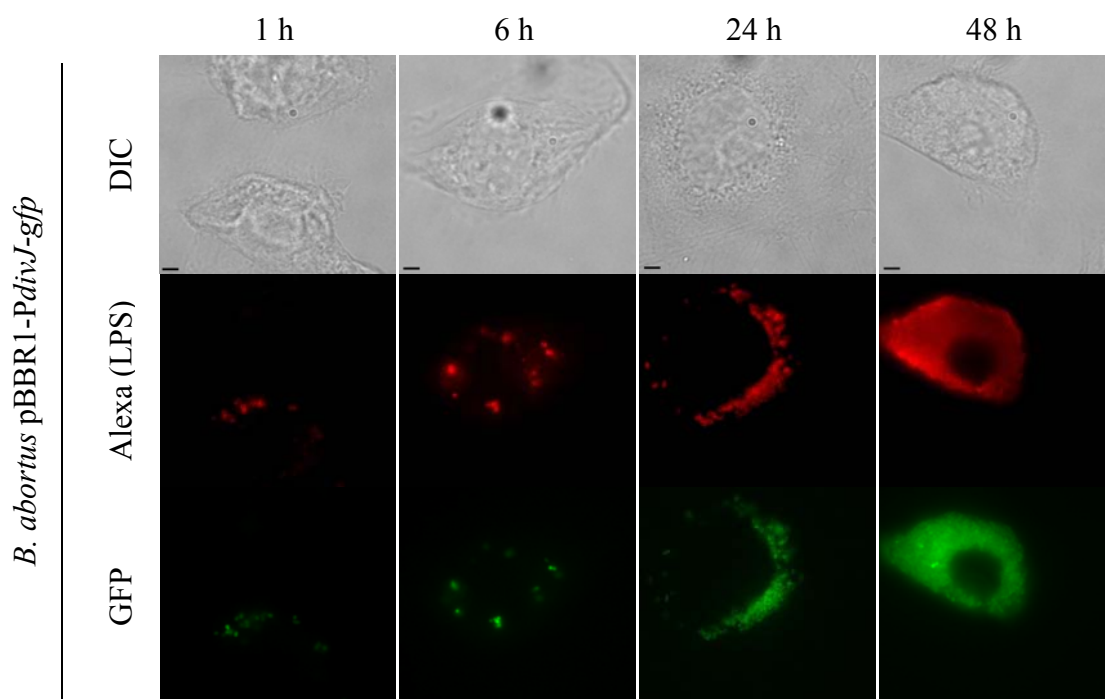
Les résultats qui ressortent de cette expérience présentent les cinq promoteurs (pour rappel, *PdivJ*, *PdivK*, *PdivL*, *PpdhS* et *PpleC*) comme actifs en tous temps sur une portion non négligeable d'une population asynchrone. Pour être rigoureux, je dois préciser que pour les cinq cultures, et ce à chaque temps, nous observons aussi bien des bactéries où la GFP est relativement fortement produite, d'autres où elle ne l'est, pour ainsi dire, quasiment pas, et entre ces deux extrêmes, toute une gamme de nuance. Par souci scientifique, il me reste à annoncer que le contrôle négatif n'émet aucun rayonnement dans les longueurs d'onde correspondant aux rayonnements émis par la GFP tandis que l'anticorps anti-LPS reconnaît parfaitement les bactéries. Ce fait assoit fermement les conclusions de l'expérience.

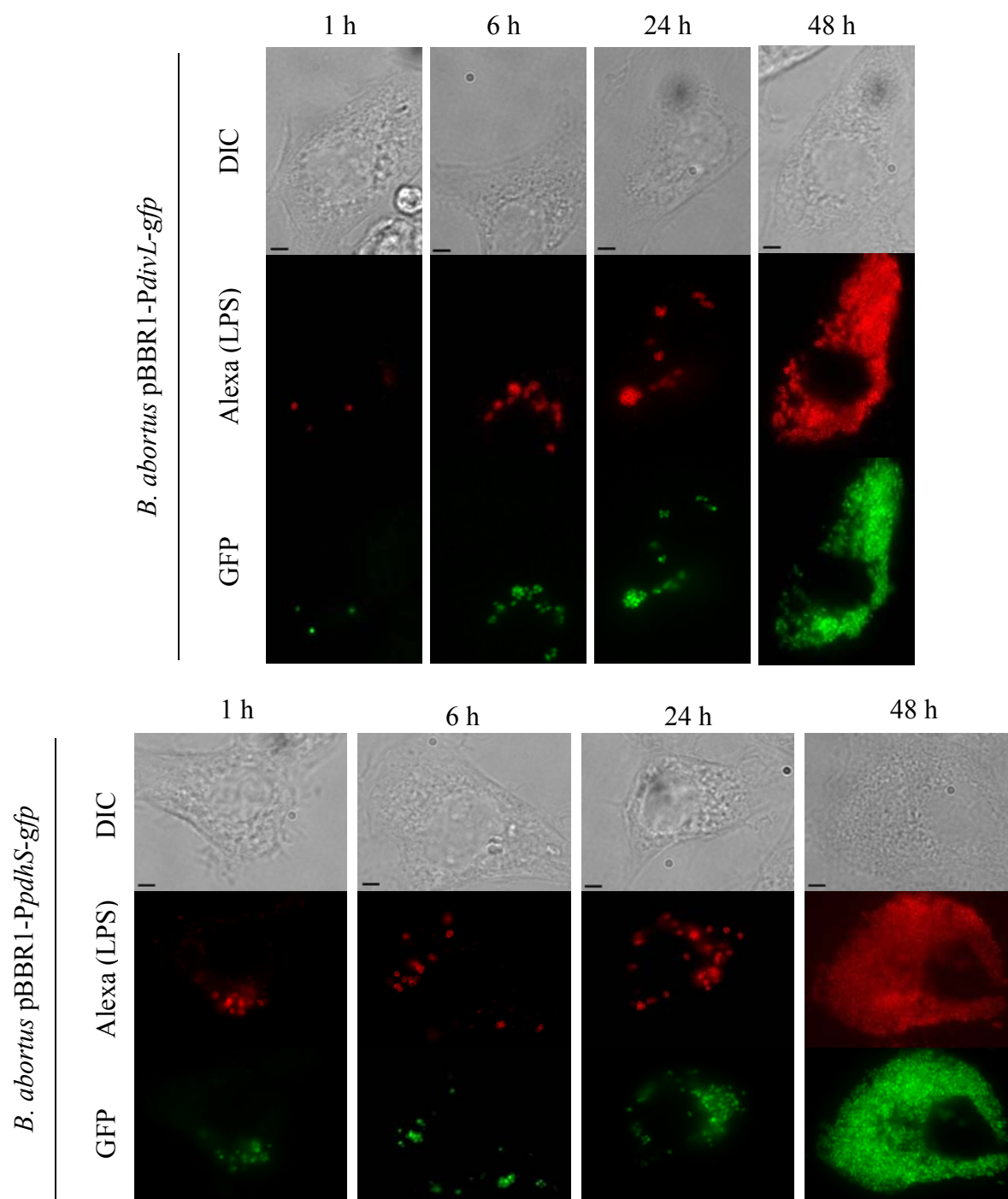
## Activité des promoteurs en condition infectieuse

Cette expérience établit le lien, annoncé dans l'introduction, entre cycle cellulaire et virulence. Elle nous permet de visualiser un niveau de régulation, à savoir un taux de transcription, du réseau d'acteurs du pathway amont de CtrA au sein de son cycle infectieux.

Sa réalisation se déroule comme suit : la veille (jour J-1), nous ensemençons six cultures liquides avec les six souches de *B. abortus*, cinq possédant chacune une construction différente et une sixième possédant le vecteur dépourvu de promoteur qui nous servira de contrôle négatif, dans du 2YT Nal25 Amp100. D'un autre côté, nous préparons sur coverslip placés en plaque 24 puits des macrophages bovins à raison de  $2,5 \times 10^4$  cellules/puits que nous laissons incuber toute une nuit. Le jour J, nous lavons les cultures bactériennes afin d'évacuer les antibiotiques, et nous les diluons ensuite dans du RPMI adapté aux macrophages bovins (RPMI<sub>mb</sub>) en tablant sur une multiplicité d'infection (MOI) d'environ 1000 bactéries/cellule hôte. Nous incubons les bactéries en présence de leur hôte pendant 1 heure à 37°C, laissant la possibilité à certaines d'initier l'infection des macrophages. Afin d'éliminer les bactéries extracellulaires, nous remplaçons le RPMI<sub>mb</sub> par du RPMI<sub>mb</sub> additionné de gentamycine, un antibiotique, pour un laps de temps à définir par l'expérimentateur. En l'occurrence, nous optons pour quatre temps-clés du cycle infectieux, les points 1, 6, 24 et 48 heures. En effet, *Brucella* atteint sa niche de réplication environ 12 heures post-infection. Il est donc intéressant d'observer qualitativement l'expression transcriptionnelle des gènes de part et d'autre de ce temps. Pour chaque point, nous fixons au PFA 4% et nous transférons les coverslip's dans une plaque 24 puits stérile. En dehors du BL3, nous procédons à la perméabilisation des cellules afin de réaliser un marquage anti-LPS des bactéries. Enfin, nous montons, avec de l'antifading, chaque coverslip sur lame pour l'observation sous microscope à épifluorescence.







**Fig. 4.** Micrographies en épifluorescence de la cinétique d'infection de macrophages bovins par *B. abortus*. Pour chaque promoteur étudié, les points 1h, 6h, 24h et 48h sont triplement visualisés. Le contraste de phase (DIC) indique la position générale de la cellule hôte, le marquage anti-LPS (en rouge) individualise les bactéries pathogènes et la GFP (en vert) constitue notre test. Le contrôle négatif (plasmide sans promoteur) répond aux mêmes critères d'observation. La barre micrométrique équivaut à 2  $\mu$ m.

À l'instar de l'expérimentation précédente, les promoteurs des cinq protéines régulatrices semblent s'exprimer en tous temps du cycle infectieux. Il convient de rester prudent, car la fluorescence pourrait trouver son origine tout autant dans une transcription active du gène que dans un résidu protéique produit durant la vie en culture libre. Cette remarque ne s'applique qu'au point 1h. Les points 6h, 24h et 48h y dérogent du fait de la dégradation de la GFP (le type de GFP utilisé est stable mais pas éternel) et de sa dilution partielle lors de la division bactérienne.

Les diverses micrographies présentées ci-dessus (Fig. 4) nous dévoilent des intensités de fluorescence relativement comparables dans une population bactérienne infectant un macrophage particulier. Les variations observées sont sans doute imputables au fait que le microscope à épifluorescence ne se focalise pas sur un plan particulier de la coupe mais prend en compte une fine tranche tridimensionnelle de l'ordre du micron, ce qui non seulement jette un flou sur un point éloigné du véritable plan focal mais diminue aussi sa fluorescence apparente.

On pourrait croire en comparant les intensités de fluorescence des promoteurs *PdivK* et *PdivJ* pour les quatre temps que le promoteur de *divJ* se trouve être plus activé. Malheureusement, rien ne peut être inféré des différences d'intensité de fluorescence qui surviennent entre les six expériences de fusion promoteur-*gfp*, ni même entre les quatre temps définis à l'intérieur de chacune de ces expériences. Les minces divergences qui existeraient seraient automatiquement masquées par le traitement numérique de chaque image (modification du contraste, de la luminosité, de la netteté,...).

En raison d'imprévus techniques, les données relatives au promoteur de *pleC* sont disponibles uniquement pour le point 48h.

## Discussion

Plusieurs faits sont à noter qui accompagnent ces deux expériences. Tout d'abord, *Brucella* semble nécessiter, sans doute dans des proportions variées, l'expression de tous ces gènes indépendamment de son style de vie, qu'il soit libre ou parasitaire.

Ensuite, faute de populations synchronisées de *Brucella* à l'état libre et vu l'hétérogénéité des intensités de fluorescence, nous ne pouvons tirer de conclusions quant à un potentiel contrôle transcriptionnel. Par contre, cette expérience nous renseigne partiellement sur un quelconque effet du quorum, de la densité bactérienne en somme, ou d'une réponse de stringence. Elle nous indique que l'expression transcriptionnelle ne varie pas positivement dans des proportions importantes à travers les quatre phases (phase de latence, phase exponentielle, phase stationnaire et phase de mortalité) d'une culture bactérienne. Les conclusions éventuelles relatives à une variation négative ne sauraient être tirées étant donné la stabilité de la GFP. En ce qui concerne l'infection de macrophages bovins, les bactéries filles issues d'une bactérie infectante unique sont en quelque sorte synchronisées, ce qui pourrait nous autoriser à commenter un effet coordonné dans une population infectante.

Comme nous l'observons sur les micrographies, la transcription différentielle de ces histidine-kinases et régulateurs de réponse, si elle a lieu, adviendrait dans une fourchette indétectable. Cela signifierait que le contrôle de CtrA est affecté dans une plus grande mesure par l'activité ou la localisation, ou les deux, de ces protéines que par la fluctuation drastique de leur concentration cytoplasmique suite à une régulation transcriptionnelle. Du reste, en se reportant au modèle *Caulobacter*, nous remarquons que l'expression d'une majorité d'histidine-kinases semble ne pas varier considérablement en condition de culture et que les changements s'observent au cours du cycle cellule et donc lors de la progression d'une population synchronisée.

Pour terminer, nous supposons que l'intensité de fluorescence relativement peu élevée observée dans les deux expériences ci-dessus relève du fait que nous nous penchons précisément sur l'expression transcriptionnelle des gènes encodant des protéines à caractère

régulateur. *A priori*, ce type de protéine semble ne requérir qu'une quantité cytoplasmique faible comparée à celle d'enzymes métaboliques dont l'activité est limitante pour l'assimilation d'un substrat.

Une solution existe qui permet une étude quantitative des variations transcriptionnelles au départ de l'outil GFP. Moyennant un appareillage adapté, les données à considérer ne relèvent pas de la simple variation d'intensité de fluorescence. Elles incluent un facteur temporel. Les conclusions tirées se basent donc sur un calcul différentiel, une dérivée<sup>(Ronen *et al.*, 2002)</sup>. Pratiquement, antérieurement à toutes modifications de la micrographie, un logiciel individualise les spots lumineux, mesure l'intensité de fluorescence de chacun, intègre le facteur temps et réalise une moyenne.

## Localisation subcellulaire

Cette expérimentation est en mesure de nous donner *in fine* une information sur la distribution cytoplasmique ou membranaire d'une protéine grâce à l'ajout d'une étiquette aisément repérable, en l'occurrence une protéine fluorescente. La visualisation pourra s'effectuer selon deux modalités : soit en temps réel grâce au time-lapse, technique qui vise à suivre pas à pas une cellule ou un groupe de cellules, soit en photographiant un instantané suite à l'immobilisation des cellules. Le contexte dans lequel vont se placer ces deux modalités est de deux types. D'un côté, il est intéressant d'observer la localisation de la protéine dans une *Brucella* sauvage tout en gardant à l'esprit les interférences potentielles avec une copie sauvage de cette protéine toujours présente. De l'autre, divers contextes mutants livrent des points de vue tantôt complémentaires, tantôt approfondis sur les principes régissant la localisation subcellulaire. Pour éclairer ce point, précisons simplement que des mutations ponctuelles et dirigées au sein de protéines, notamment dans leurs sites de phosphorylation, ou que des délétions entières d'un de leurs domaines sont en mesure de dissocier les diverses fonctions que ces protéines remplissent<sup>(Jacobs *et al.*, 1999, Lam *et al.*, 2003)</sup>.

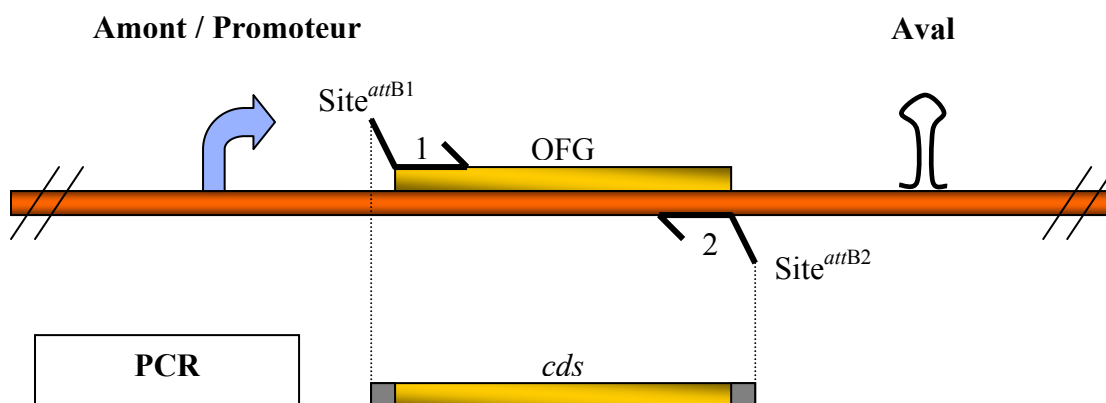
Quel qu'en soit le contexte, la localisation subcellulaire nécessite l'élaboration de plusieurs outils plasmidiques dont l'expression produira des protéines en fusion traductionnelle avec une étiquette fluorescente.

L'approche utilisée pour construire le plasmide final employé pour l'observation de la localisation est un clonage de type Gateway (GW<sup>TM</sup>) se ramifiant en deux prolongements : la construction du vecteur d'entrée d'une part et celle du vecteur de destination d'autre part. Pour une explication approfondie du système GW<sup>TM</sup>, il faut se reporter au paragraphe correspondant dans le chapitre matériel et méthodes (page n°58).

### Construction des vecteurs d'entrée

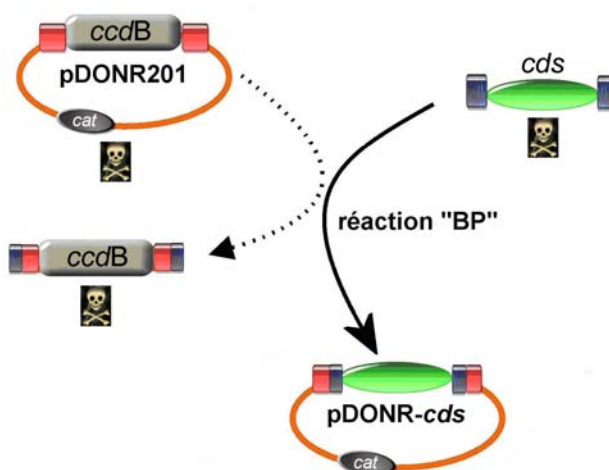
Les deux RR (CtrA et DivK) étant d'ores et déjà disponibles au laboratoire, seules les cinq kinases (CckA, DivJ, DivL, PdhS et PleC) demandent d'être clonées. À l'instar de la construction précédente, ce clonage s'opère en deux étapes :

1. Nous amplifions dans un premier temps la séquence codante (CDS) de chaque gène au moyen d'une paire d'amorces dont l'extrémité 3' de 20 pb s'hybride sur la séquence d'intérêt et dont l'extrémité 5' contient, pour l'une, le site de recombinaison GW<sup>TM</sup> *attB1*, pour l'autre, le site *attB2* (Fig. 5). Le produit PCR ainsi obtenu est constitué, outre les sites *attB1* et *attB2* aux extrémités, d'une séquence débutant exactement à l'ATG (correspond au codon d'initiation de traduction AUG d'une protéine) et continuant sur toute la CDS jusqu'au pénultième codon, excluant le codon STOP et de ce fait acceptant ultérieurement la fusion avec un tag fluorescent sur l'extrémité carboxy-terminale de la protéine.



**Fig. 5.** Amplification de la séquence codante des gènes d'intérêt (CDS).

2. La seconde étape consiste à réaliser une réaction BP pendant minimum 2 heures du produit PCR en présence du vecteur pDONR201 (Fig. 6). Le fragment inséré est ensuite séquencé pour s'assurer qu'il ne contient pas de mutation pernicieuse.

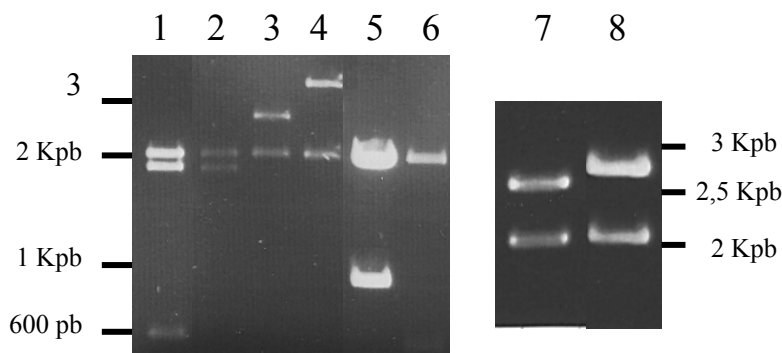


**Fig. 6.** Schéma de la réaction BP entre le pDONR201 et le gène d'intérêt *cds*.

Afin de visualiser et d'éprouver les cinq constructions ainsi que deux autres disponibles au laboratoire, nous les restreignons, en guise de diagnostic, et les faisons migrer sur un gel d'agarose (Fig. 7).

n°	Plasmide	Restriction en :	Bande commune	Bande(s) spécifiques(s)
1	pDONR201	<i>Hpa</i> I/ <i>Pvu</i> II	2023 pb	1845 pb      602 pb
2	pDONR201- <i>divJ</i>			1825 pb
3	pDONR201- <i>pleC</i>			2585 pb
4	pDONR201- <i>pdhS</i>			3340 pb
5	pDONR201- <i>ctrA</i>			931 pb
6	pDONR201- <i>divK</i>			604 pb
7	pDONR201- <i>cckA</i>			2626 pb
8	pDONR201- <i>divL</i>			2812 pb





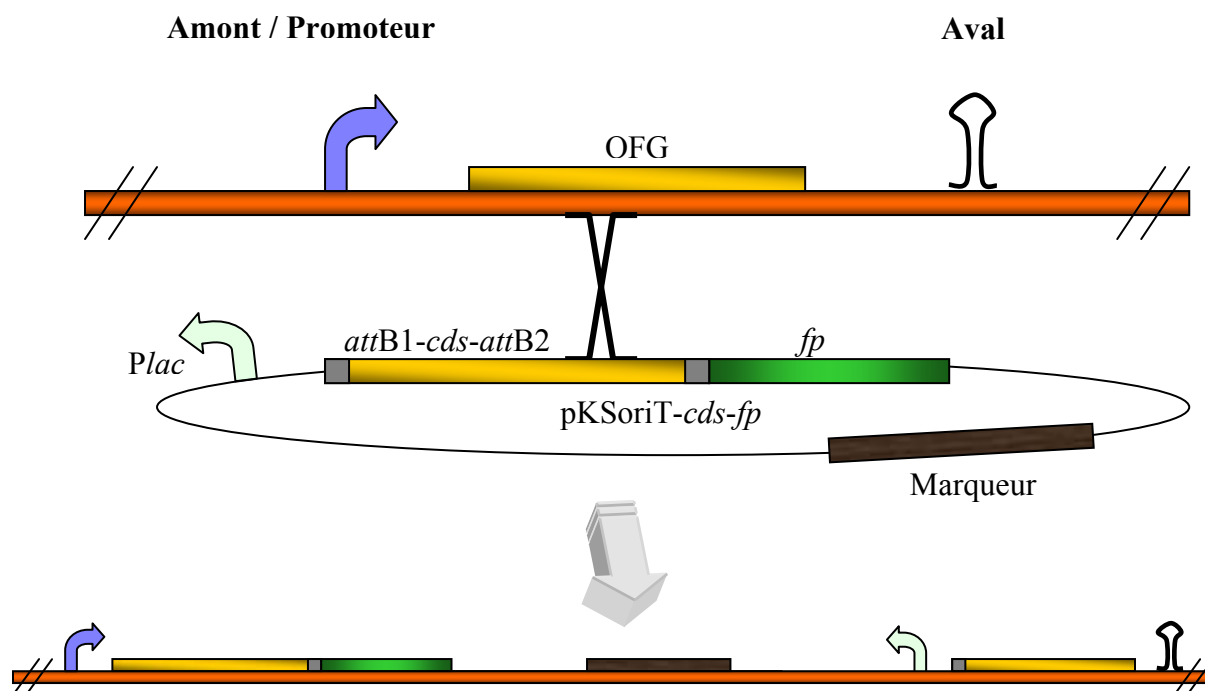
**Fig. 7.** Électrophorèse en gel d'agarose 1% des constructions restreintes en *Hpa* I/*Pvu* II. A gauche, l'échelle de tailles. Pistes : 1, pDONR201 ; 2, pDONR201-*divJ* ; 3, pDONR201-*pleC* ; 4, pDONR201-*pdhS* ; 5, pDONR201-*ctrA* ; 6, pDONR201-*divK* ; 7, pDONR201-*cckA* ; 8, pDONR201-*divL*.

Nous observons, comme escompté, une bande commune et une ou deux bandes spécifiques à chaque plasmide.

## Construction des vecteurs de destination

Ce sont ces constructions qui vont véritablement permettre le couplage d'une CDS à une étiquette fluorescente. Trois types d'étiquette ont été choisis : la GFP, la CFP et la YFP qui émettent des photons dans des longueurs d'onde correspondant respectivement au vert, au bleu et au jaune. Elles s'effectuent en trois temps :

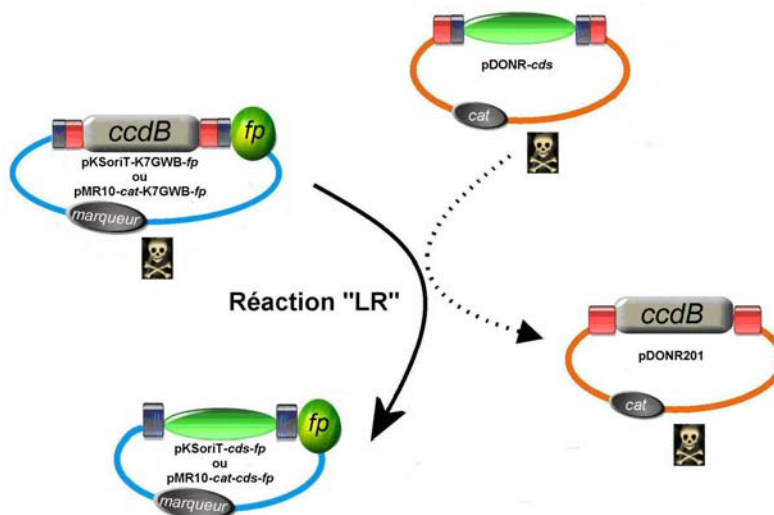
1. Nous sortons la séquence encodant la *gfp* par restriction du pFA6-*gfp* avec *Sma* I et *Hind* III que nous insérons de manière directionnelle en *Eco*R V/*Hind* III dans le pKSoriT. Pour les gènes *cfp* et *yfp*, la restriction du pFA6-*cfp* ou -*yfp* s'effectue en *Sma* I et se clone dans le pKSoriT en *Eco*R V. Dans ces deux types constructions criblées par un test blanc/bleu, il sera nécessaire de vérifier la directionnalité du clonage. Le pKSoriT est un plasmide mobilisable mais non répliquatif. Cette propriété autorise l'intégration de ce plasmide au locus d'intérêt, avec comme résultante une CDS en fusion avec l'étiquette, le tout sous contrôle du promoteur natif ainsi qu'une seconde CDS identique sans fusion ni promoteur (Fig. 8). Dans cette optique, nous devons donc sélectionner les plasmides dont le sens de transcription est inverse au sens d'activation transcriptionnelle du promoteur de l'opéron lactose (*Plac*) présent dans le pKSoriT, justement pour éviter que la seconde CDS soit transcrite et que ceci crée des interférences avec la CDS en fusion.
2. Nous insérons ensuite en *Sma* I une cassette GW<sup>TM</sup> de type B (K<sub>7</sub>GWB) constituée d'un gène de résistance au chloramphénicol et d'un gène de toxicité *ccdB* le tout bordé par un site *attR*1 d'un côté et d'un site *attR*2 de l'autre. Dans cette étape, il faudra de même s'assurer, par exemple par PCR diagnostiques, que la cassette GW<sup>TM</sup> est correctement orientée par rapport à l'étiquette. À ce stade, nous sommes en possession d'un plasmide capable, suite à une réaction LR effectuant le remplacement de la cassette GW<sup>TM</sup> par une CDS d'intérêt, de fournir une fusion traductionnelle entre CDS et étiquette fluorescente sous le contrôle du promoteur naturel de ce gène dans un contexte chromosomique, et ce via une simple recombinaison au locus d'intérêt (Fig. 8). Nous nommerons dorénavant ces plasmides pKSoriT-K<sub>7</sub>GWB-*gfp*, -*cfp* ou encore -*yfp*, que nous gardons précieusement.



**Fig. 8.** Schéma d'intégration du pKSoriT-CDS-*fp* dans le chromosome.

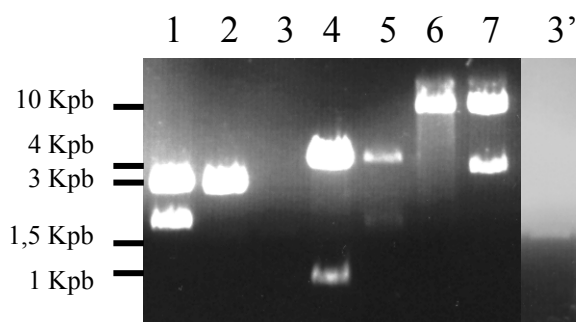
- De plus, nous excisons le fragment K<sub>7</sub>GWB-*fp* en *Xba* I/*Xho* I des trois pKSoriT-K<sub>7</sub>GWB-*fp* (où *fp* indique l'une des trois protéines fluorescentes) pour l'insérer dans le pMR10-*cat* restreint en *Xba* I/*Bam* H I. Ces trois constructions, appelées pMR10-*cat*-K<sub>7</sub>GWB-*gfp*, -*cfp* ou -*yfp* permettront une fusion traductionnelle sous contrôle du *Plac* dans un contexte plasmidique à faible nombre de copies (Fig. 9). Par mesure de précaution, nous avons séquencé les fragments reliant la K<sub>7</sub>GWB aux trois *fp* pour nous assurer que, dans le vecteur d'expression, la CDS d'intérêt soit effectivement fusionnée avec la *fp*.

**Fig. 9.** Schéma de la réaction LR entre le pDONR-*cds* et le vecteur de destination



Afin d'éprouver les différentes constructions présentées dans cette partie, nous réalisons une restriction diagnostique (Fig. 10).

n°	Fragment/plasmide	Restriction en :	Profil attendu		
1	pFA6- <i>gfp</i>	<i>Sma</i> I / <i>Hind</i> III	2955 pb	1898 pb	29 pb
2	pKSoriT	<i>Bam</i> H I / <i>Bgl</i> II	3197 pb		
3	K <sub>7</sub> GWB	-	1700 pb		
4	pKSoriT- <i>gfp</i>	<i>Bam</i> H I / <i>Bgl</i> II	4099 pb	990 pb	
5	pKSoriT-K <sub>7</sub> GWB- <i>gfp</i>	<i>Bam</i> H I / <i>Bgl</i> II	4099 pb	1791 pb	703 pb 209 pb
6	pMR10- <i>cat</i>	<i>Xba</i> I / <i>Xho</i> I	10 Kpb		
7	pMR10- <i>cat</i> -K <sub>7</sub> GWB- <i>gfp</i>	<i>Xba</i> I / <i>Xho</i> I	10 Kpb		3668 pb



**Fig. 10.** Électrophorèse en gel d'agarose 1% des constructions restreintes comme indiqué ci-dessus et des fragments d'ADN. A gauche, l'échelle de tailles. Pistes : 1, pFA6-*gfp* ; 2, pKSoriT ; 3 et 3', K<sub>7</sub>GWB ; 4, pKSoriT-*gfp* ; 5, pKSoriT-K<sub>7</sub>GWB-*gfp* ; 6, pMR10-*cat* ; 7, pMR10-*cat*-K<sub>7</sub>GWB-*gfp*.

Les profils théoriques correspondent effectivement aux profils visualisés sur cette photographie. Remarquons que les fragments plus petits ou égaux à 700 pb sont indétectables, faute d'une quantité initiale suffisante du plasmide. Remarquons aussi que les pistes 3 et 3' présentent le même gel photographié sous deux luminosités différentes, ceci afin de visualiser en 3' (←) la bande prédite mais indétectable en 3.

## Construction des vecteurs d'expression

Il ne reste plus qu'à effectuer une réaction LR entre vecteurs d'entrée et vecteurs de destination pour obtenir au final les différents vecteurs d'expression. Suite à cette étape, deux types d'outil plasmidique sont à notre disposition : le pKSoriT-*cds-fp* et le pMR10-*cat-cds-fp*, chacun pourvu d'avantages et d'inconvénients. Le premier, plasmide intégratif, sera préférentiellement utilisé pour l'étude de la localisation de protéines encodées par des gènes placés dans un contexte chromosomique et sous contrôle du promoteur natif, cas plus proche du contexte général du réseau bactérien. Le second, plasmide réplcatif, s'utilisera lorsque la protéine est faiblement produite dans le cas précédent, ce qui génère un signal fluorescent indétectable. Le *Plac* présent sur le plasmide, ainsi que le nombre de copies supérieur à un, pallient, avec éventuellement des risques de modifications du réseau, ce problème de signal faible en surproduisant légèrement la protéine d'intérêt en fusion à l'étiquette.

## Discussion

La double construction d'un outil de fluorescence n'est pas une démarche vaine. En effet, une précipitation de la protéine chimérique est susceptible de se produire à l'intérieur de la bactérie dans la mesure où cette protéine est en surabondance. Généralement, elle survient aux

deux pôles, mais il n'est théoriquement pas exclu que le précipitat aille se loger à l'un d'eux uniquement. Problème plus délicat, le précipitat peut se révéler être autofluorescent et peut erronément simuler un pattern de localisation. Une solution pour limiter les effets d'une précipitation serait d'observer l'expression de la fusion *cds-fp* dans un contexte chromosomique sous contrôle du promoteur natif. Si le pattern de localisation est identique pour les deux types de construction, alors l'hypothèse d'une localisation polaire sera renforcée.

Remarquons que ce problème de précipitation est également éludé par l'utilisation de la technique du time-lapse, le précipitat étant incapable de se mouvoir d'un pôle à l'autre ou de disparaître une fois formé.

La réalisation de trois étiquettes fluorescentes pour les deux types de construction apporte un avantage substantiel. En effet, ces trois étiquettes fusionnées à trois protéines distinctes permettent la visualisation simultanée au sein d'une même bactérie les trois patterns de localisation de ces protéines. En pratique, seuls deux plasmides permettant l'expression de deux fusions traductionnelle seront testés conjointement dans une souche bactérienne.

Faute de temps, les diverses constructions élaborées ci-dessus font figure de résultats. Cependant, elles ouvrent, dans le cadre d'un autre travail, la voie, si pas vers la compréhension des processus de localisation, au moins vers les profils de cette dernière. Une perspective très intéressante serait en effet d'intégrer les pKSoriT-*cds-fp* dans le génome pour observer en time-lapse la distribution des diverses protéines, les confronter aux patterns étudiés chez *C. crescentus* et chez *S. meliloti* et ébaucher un canevas typique au genre *Brucella*.

## Obtention et caractérisation de délétants

Cette approche s'inscrit dans une optique génétique. Décortiquer le réseau de régulation, établir les liens hiérarchiques interconnectant les protagonistes, interpréter l'effet global d'une protéine ou de son absence sur les caractéristiques de la bactérie sont les objectifs théoriques plausibles émanant de cette manipulation. Cette technique confère deux avantages par rapport à un mutant ponctuel créé de manière aléatoire. Tout d'abord, un délétant est un mutant conçu de manière spécifique, dirigée alors que la mutagenèse aléatoire génère une banque de mutants tous différents pour lesquelles la position et le nombre de mutations sont inconnus. Après sélection des mutants présentant un phénotype d'intérêt, il faut par la suite les compléter avec une banque de cosmides afin d'identifier le gène ponctuellement muté. Second argument, le délétant est un mutant nul, c'est-à-dire une souche débarrassée complètement de sa copie génomique, et perd de ce fait toutes les fonctions de la protéine. Dans le cas d'un mutant ponctuel aléatoire, même dans l'éventualité où l'endroit et la nature de la mutation sont connus, il sera difficile de déterminer si la protéine mutée a perdu sa fonction ou si elle en a gagné une nouvelle (augmentation d'activité catalytique ou de cinétique de reconnaissance d'une autre protéine, perturbation de mécanismes moléculaires par compétition,...). En réalité, la mutagenèse aléatoire s'emploie dans la recherche, sans *a priori*, d'acteurs d'un réseau, de protagonistes assurant une fonction commune. Cependant, un inconvénient subsiste dans la technique délétant : une protéine qui assumerait plusieurs fonctions, les verrait toutes s'annihiler sans discrimination après la délétion. Remarquons qu'un mutant ponctuel dirigé échappe à ce désavantage et permet la dissection des fonctions de la protéine touchée.

Quatre gènes du pathway CtrA sont désignés pour une étude phénotypique de leur délétion, à savoir *divJ*, *divK*, *pdhS* et *pleC*. À nouveau, les raisons qui nous ont conduits à opter pour ces quatre gènes viennent des résultats obtenus en test double hybride, évoqués dans l'introduction et dans le chapitre fusion promoteur-*gfp*. Ignorant la fonction exacte de PdhS (kinase, phosphatase, ou autre), nous ne pouvons ôter ni DivJ ni PleC de cette analyse. En ce qui concerne DivL, sa fonction encore obscure chez *C. crescentus* jointe à son caractère essentiel chez cette même bactérie, nous ont poussés à l'écarter de notre étude.

Spécifions que nous partons avec un *a priori* en ce qui concerne la délétion de *divK* et que cette expérience constituera sans doute une évidence négative confirmant sans plus aucune contestation possible l'essentialité de ce gène chez *Brucella*.

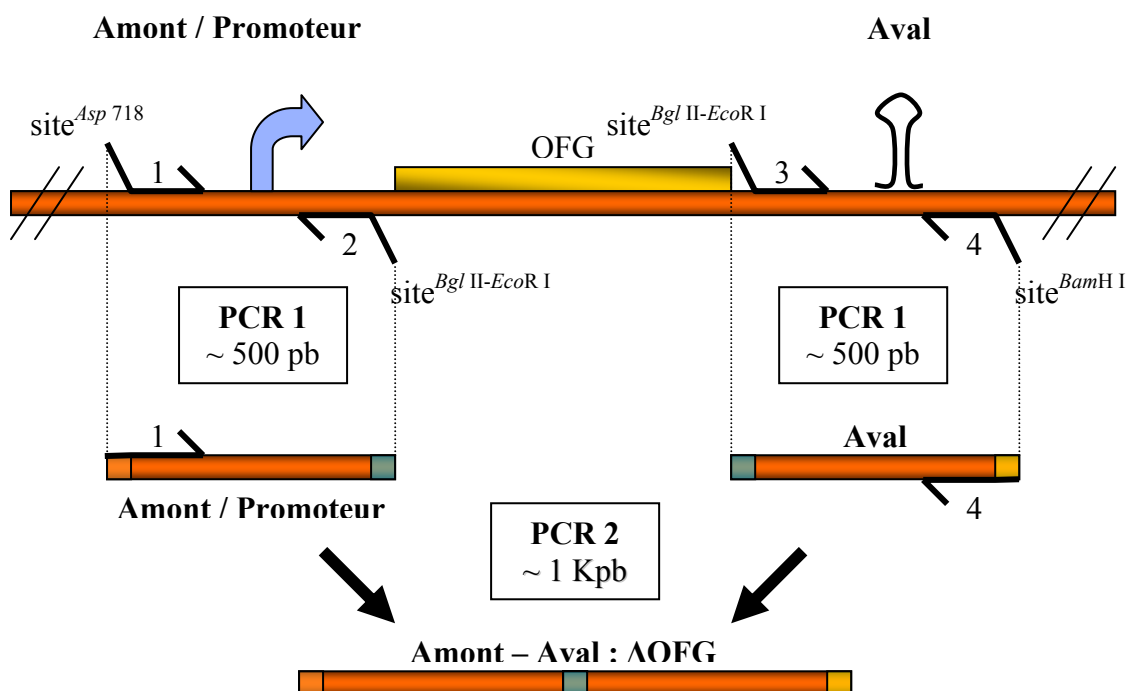
## Construction de l'outil plasmidique

La finalité de cette expérience est de créer quatre souches amputées chacune d'un des quatre gènes susnommés. La technique utilisée se base sur un échange allélique. En pratique, nous aboutons des portions de la région promotrice et de la région en aval de la CDS suffisamment importante que pour privilégier une double recombinaison, et nous insérons une cassette de résistance entre les deux afin de pouvoir sélectionner les délétants.

Quatre étapes sont nécessaires à la réalisation du vecteur utilisé pour provoquer la délétion :

1. Nous reprenons les quatre fragments Amont/Promoteur amplifiés lors de la construction des fusions promoteur-*gfp* (Fig. 1). Pour rappel, l'amorce 1 possède un site de restriction

pour l'enzyme *Asp* 718 et l'amorce 2, deux sites, un *Bgl* II et un *Eco*R I sur leur extrémité 5'. En parallèle, nous amplifions de manière similaire un fragment correspondant à la région aval des quatre gènes d'intérêt (Fig. 11). Nous concevons pour ce faire une paire d'amorces délimitant environ 500 paires de bases capables toutes deux de s'hybrider sur une portion de la région aval grâce aux 20 derniers nucléotides de leur extrémité 3' et abritant sur leur extrémité 5' deux sites de restriction aux enzymes *Bgl* II et *Eco*R I pour l'amorce forward (n°3) et un site de restriction à l'enzyme *Bam*H I pour l'amorce reverse (n°4).



**Fig. 11.** Amplification des parties amont et aval des gènes d'intérêt (OFG), séparément et conjointement.

2. Une seconde PCR amplifie un fragment total d'environ 1 Kpb au départ des deux produits PCR de 500 pb et des amorces n°1 et n°4 (Fig. 11). Ce sont les sites introduits par les amorces n°2 et n°3 qui fournissent une dizaine de paires de bases permettant d'aboutir la région amont à la région aval. Les quatre produits PCR finaux seront dénommés  $\Delta divJ$ ,  $\Delta divK$ ,  $\Delta pdhS$  et  $\Delta pleC$  respectivement pour les gènes *divJ*, *divK*, *pdhS* et *pleC*.
3. Après la purification des produits PCR et leur analyse en gel d'agarose (électrophorèse), nous restreignons les fragments  $\Delta OFG$  avec *Asp* 718 et *Bam*H I. Cette étape permet, par la suite, d'opérer un clonage directionnel dans le pSKoriT, restreint par les mêmes enzymes. Ces deux produits de restriction, suite à leur purification, sont mis en présence dans un rapport moléculaire insert/matrice de 1/1. Le plasmide pSKoriT- $\Delta OFG$  est criblé par un test blanc/bleu, sélectionné par restrictions diagnostiques et validé par séquençage du fragment  $\Delta OFG$ . Pour cette construction, quelques mutations éparses ne sont pas dramatiques puisque, *in fine*, plus aucune transcription des gènes d'intérêt ne devrait avoir lieu. Parce que *divK* est organisé en opéron avec *pleD* à sa suite et qu'une mutation dans la région amont peut perturber la régulation transcriptionnelle et qu'une mutation dans la partie aval peut échouer dans *pleD* lui-même, aucune mutation n'est tolérée.

4. La dernière étape consiste à intégrer une cassette de résistance à la kanamycine (sortie par *Bam*HI du plasmide pUC4K) dans le pSKoriT-ΔOFG restreint par *Bgl*II, site présent entre la partie amont et la partie aval (Fig. 12). La direction du clonage n'a, dans le cas présent, que peu d'importance étant donné que le gène *kan<sup>R</sup>* (*npt*) possède son propre promoteur. Nous effectuons néanmoins une restriction diagnostique pour s'assurer du simple événement d'insertion et de son sens. Le produit obtenu est nommé pSKoriT-ΔOFG::*kan<sup>R</sup>*.

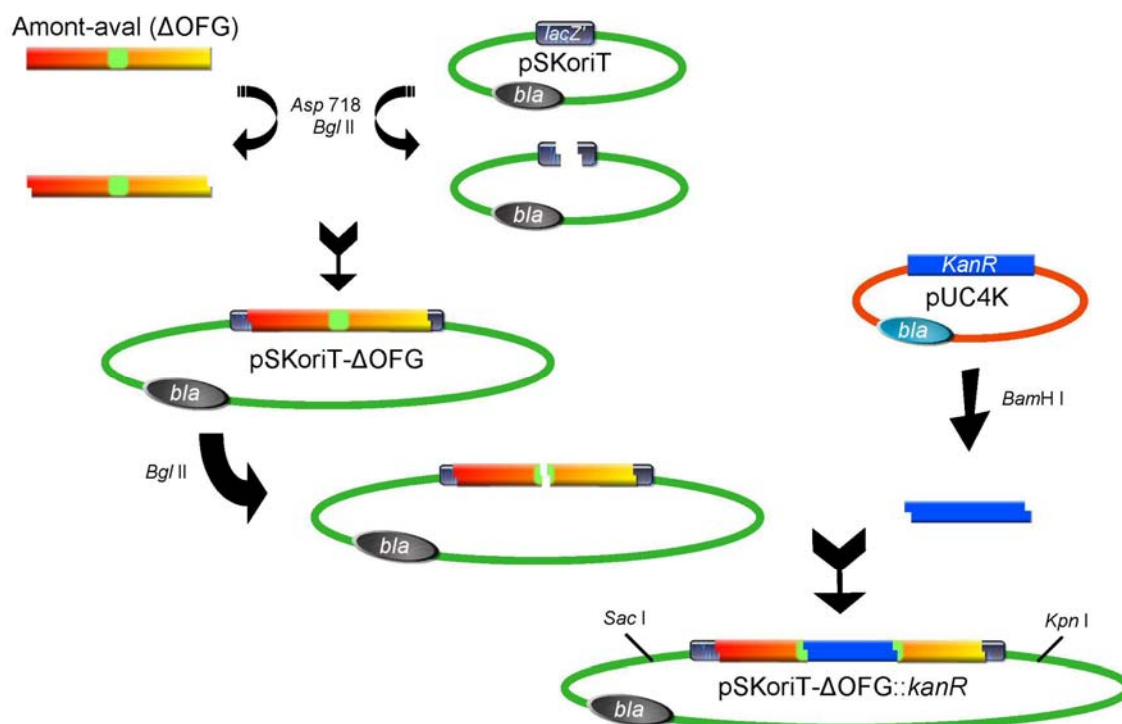


Fig. 12. Introduction du produit PCR dans le pSKoriT suivi du clonage de la cassette *kan*.

Le vecteur ainsi fabriqué et vérifié est introduit par conjugaison dans *B. abortus*. Nous repiquons et sélectionnons ensuite les clones capables de pousser sur Kan. Une seconde étape de repiquage sur un milieu Kan (contrôle positif) en parallèle avec un autre milieu ampicilline (Amp) nous informera s'il s'agit d'une souche avec un simple ou un double événement de recombinaison. En effet, trois éventualités sont prédictibles à ce stade (Fig. 13) :

- Soit un seul événement a lieu ou dans le promoteur ou dans le terminateur et le plasmide se réplique grâce à l'origine de répllication d'un des deux chromosomes. La souche est alors Kan<sup>R</sup> ; Amp<sup>R</sup>.
- Soit un double événement se produit dans le promoteur et le terminateur, cas de figure qui nous intéresse, et la cassette de délétion est incorporée au génome. Le plasmide néoformé comportant le gène d'intérêt sauvage est quant à lui éliminé faute d'origine de répllication. La souche candidate est donc Kan<sup>R</sup> ; Amp<sup>S</sup>.
- Soit l'intégration se passe de manière ectopique et le phénotype est identique à l'intégration (simple événement de recombinaison), à savoir Kan<sup>R</sup> ; Amp<sup>R</sup>.

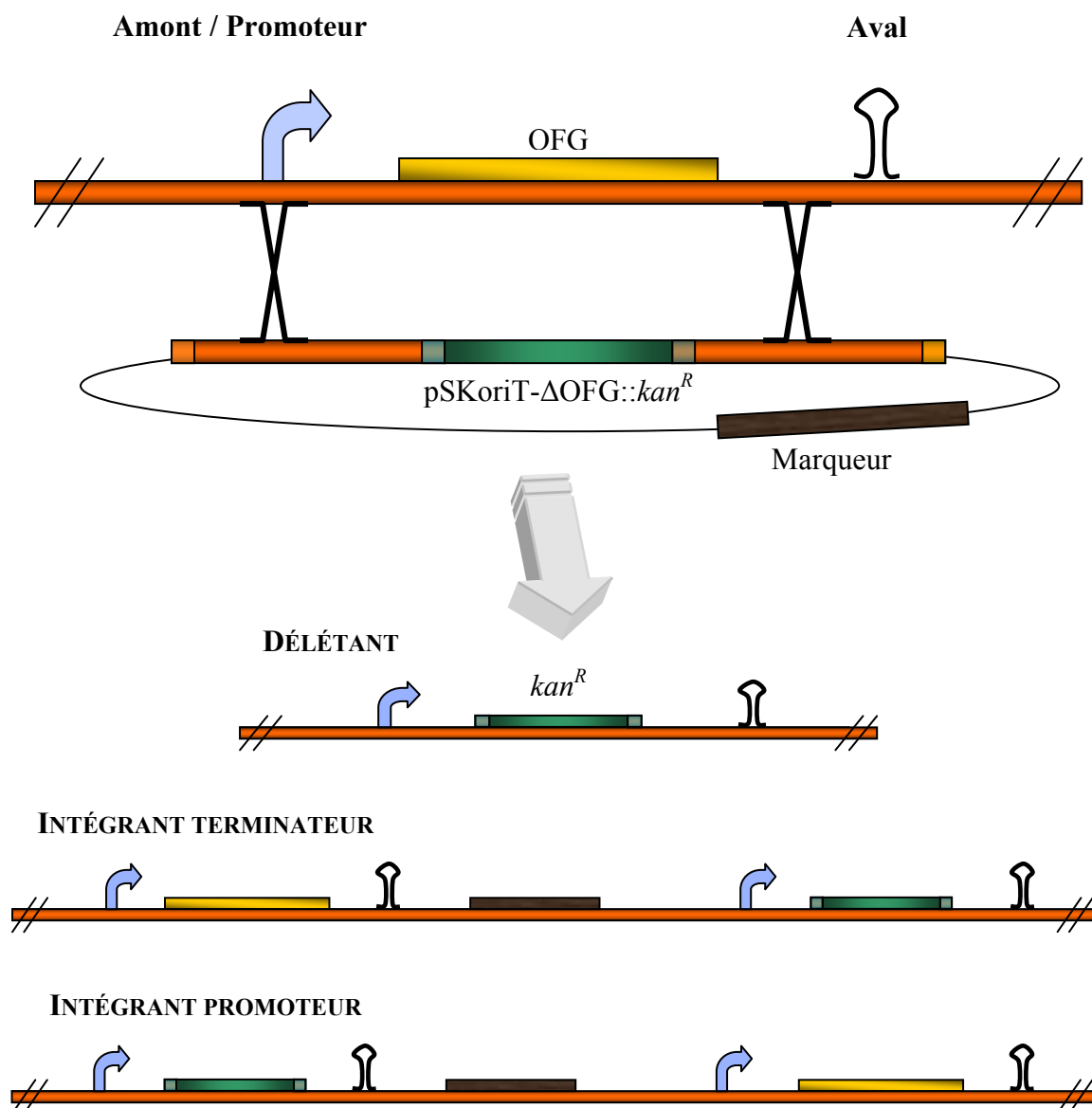


Fig. 13. Éventualités de recombinaison entre construction plasmidique et génome.

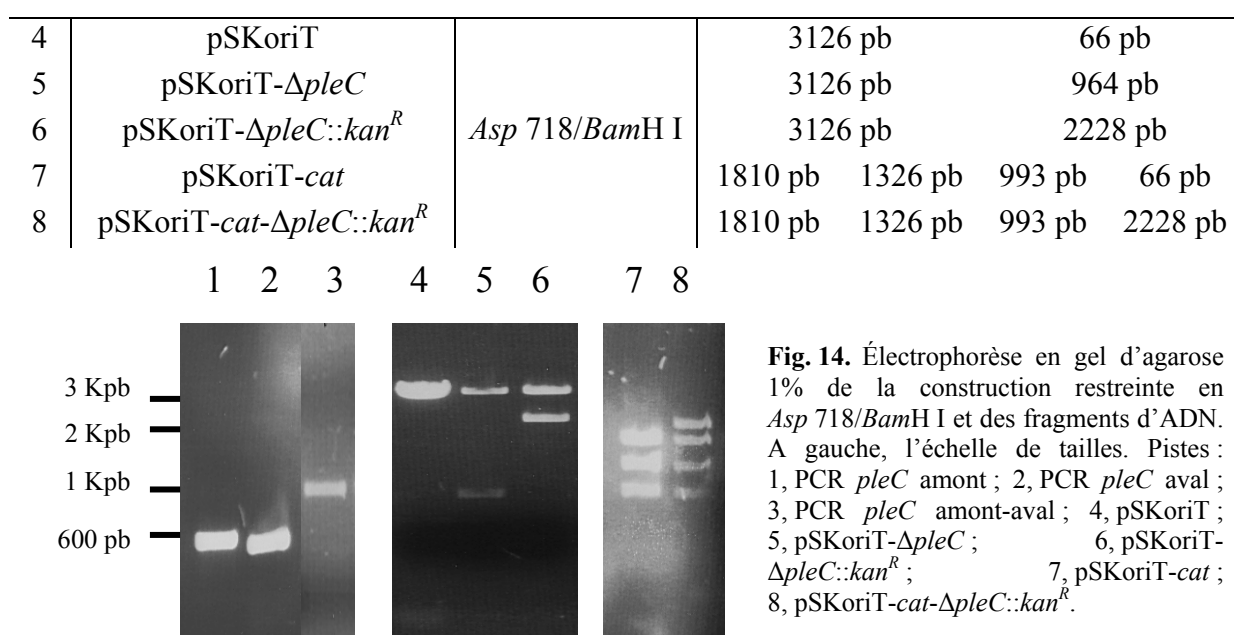
Cette première sélection est ensuite confirmée par une PCR diagnostique suivie, si les résultats PCR sont encourageants, d'un Southern blot.

Des résultats contradictoires, à savoir l'obtention de clone Kan<sup>R</sup> Amp<sup>S</sup> mais avec un profil typique d'intégrant en Southern blot, nous ont forcés à rediriger notre stratégie : notre gène marqueur a dû être remplacé. Pour ce faire, nous avons transféré le fragment ΔOFG::kan<sup>R</sup> du pSKoriT-ΔOFG::kan<sup>R</sup> au pSKoriT-cat, par restriction préalable en *Sac* I/*Kpn* I, pour obtenir *in fine* le pSKoriT-cat-ΔOFG::kan<sup>R</sup>.

Afin d'éprouver les diverses constructions présentées ci-dessus, nous les restreignons et visualisons les fragments sur gel d'agarose (Fig. 14). Étant donné les faibles variations entre les quatre constructions, nous renseignons uniquement le cas du gène *pleC*.

n°	Fragment/plasmide	Restriction en :	Profil attendu
1	PCR <i>pleC</i> amont	-	526 pb
2	PCR <i>pleC</i> aval		466 pb
3	PCR <i>pleC</i> amont-aval		974 pb

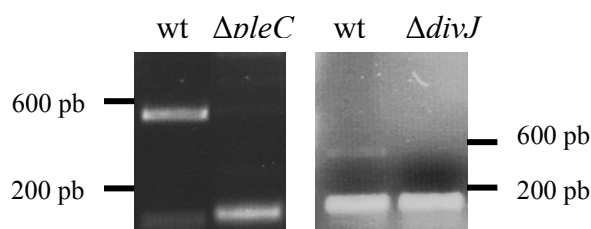




Par cette figure, nous observons indubitablement la progression du clonage. En 3, la bande correspond à la somme des bandes en 1 et 2. En 5 et 6, nous assistons respectivement à un premier shift de la bande à 66 pb, invisible en 4, pour une bande de 964 pb correspondant à l'insert (3) et à un second à 2228 pb résultant de l'incorporation de la cassette *kan<sup>R</sup>*. En 8, la bande de 66 pb invisible en 7 est remplacée par une bande de 2228 pb correspondant à la région  $\Delta OFG::kan^R$ .

Suite à maints aléas expérimentaux, nous sommes parvenus à isoler un mutant pour le gène *pleC* et un mutant pour le gène *divJ*. Les candidats délétants ont dans un premier temps été testés en PCR (Fig. 15). Un mix, contenant entre autres des amorces censées amplifier une portion interne de *pleC* ou *divJ*, a été distribué entre deux tubes, l'un comportant l'ADN génomique de la sauvage, et le second comportant celui du candidat mutant. Dans ces conditions, nous n'assisterons à une amplification de 541 pb pour *pleC* et 505 pb pour *divJ* que dans un contexte sauvage ou intégrant, c'est-à-dire dans un contexte où le gène sauvage est présent. Pour s'assurer de la bonne marche de la PCR, nous ajoutons dans le mix commun un contrôle positif constitué d'une paire d'amorces amplifiant une région interne de *ctrA* de l'ordre de 130 pb.

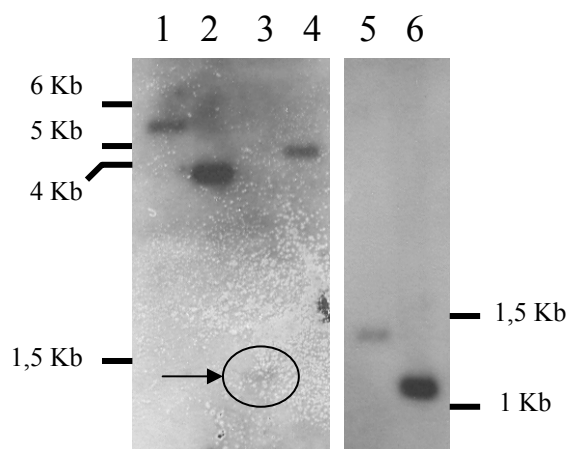
**Fig. 15.** Électrophorèse en gel d'agarose 1% des fragments amplifiés par PCR au départ d'ADN génomique de *B. abortus*. Sur l'extérieur, les échelles de tailles. A gauche, le candidat  $\Delta pleC$ . Pistes : wt, sauvage ;  $\Delta pleC$ , candidat délétant  $\Delta pleC$ . A gauche, le candidat  $\Delta divJ$ . Pistes : wt, sauvage ;  $\Delta divJ$ , candidat délétant  $\Delta divJ$ .



Ce test étant concluant, nous avons décidé d'effectuer un Southern blot sur les deux candidats délétants (Fig. 16). Cette technique se déroule comme suit : l'ADN génomique de la souche candidate est restreint. Les fragments divers sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose 1% et sont transférés sur une membrane de nylon. À l'aide d'une sonde spécifique fabriquée à partir du gène de résistance à la kanamycine, nous mettons en évidence la bande d'intérêt d'environ. En guise de contrôle négatif, nous incluons dans l'expérience l'ADN génomique de la sauvage restreint avec les mêmes enzymes. Remarquons que, préalablement

au transfert, nous photographions sur le gel le smear pour nous assurer du bon déroulement de la restriction.

n°	1	2	3	4	5	6
ADNg de :	sauvage	$\Delta pleC$	sauvage	$\Delta pleC$	sauvage	$\Delta divJ$
Restriction en :	<i>Hind</i> III		<i>EcoR</i> V		<i>Hind</i> III	
Sonde radioactive	PCR promoteur		PCR promoteur		PCR terminateur	
Profil attendu	5,5 Kpb	3,7 Kpb	1,4 Kpb	4,5 Kpb	1,4 Kpb	1,2 Kpb
Profil intégrant promoteur	-	7,1 Kpb 3,7 Kpb	-	7,8 Kpb	-	5,3 Kpb 1,4 Kpb
Profil intégrant terminateur	-	5,5 Kpb 5,3 Kpb	-	11 Kpb 1,4 Kpb	-	5,5 Kpb 1,2 Kpb



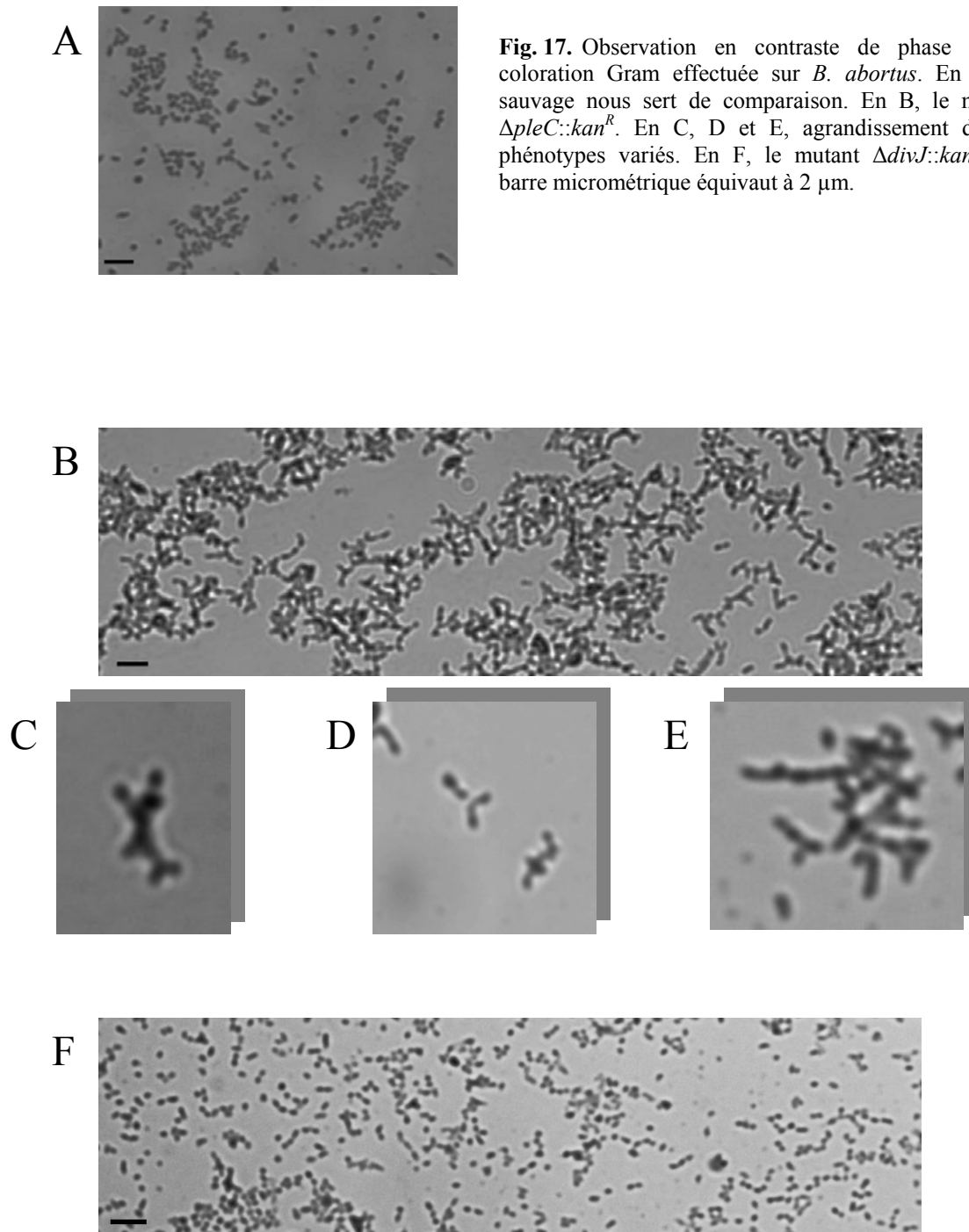
**Fig. 16.** Southern blot sur ADN génomique de *B. abortus*. A l'extérieur, les échelles de tailles. Pistes : 1, 3 et 5 : souche sauvage ; 2 et 4 : candidat délétant *pleC* ; 6 : candidat délétant *divJ*. Le cercle indiqué d'une flèche circonscrit une bande peu discernable.

Nous remarquons que les six profils sont très limpides (impossibilité de confondre délétants et intégrants ou délétants et sauvages) et respectent nos prévisions.

Ces trois évidences indépendantes (sensibilité/résistance, PCR et Southern blot), nous poussent vivement à considérer ces candidats  $\Delta pleC$  et  $\Delta divJ$  comme des délétants avérés.

## Caractérisations phénotypiques

Première constatation : de manière somme toute prévisible, ces gènes, à l'instar de *c<sub>c</sub>pleC* et de *c<sub>c</sub>divJ*, ne sont pas essentiels. La toute première réaction, outre leur stockage dans un lieu sûr, a été d'exécuter une coloration Gram afin d'observer un potentiel phénotype global sur la population (Fig. 17).



De cette coloration Gram, nous retirons plusieurs observations. Focalisons-nous dans un premier temps sur le délétant *pleC*. De prime abord, une vision globale des populations sauvage et mutante, nous expose un délétant arborant un phénotype très différent comparé au phénotype sauvage, une sorte d'agglutination de cellules, de comportement grégaire, trop flou pour être précisé.. Un léger grossissement de bactéries isolées affine notre première impression et dévoile trois morphologies particulières. Pour commencer, certaines bactéries prennent l'aspect de triade, de Y résultant probablement d'une division anarchique ou de la croissance d'un pôle supplémentaire. Nous pouvons facilement imaginer qu'après une division banale de deux bactéries, à ceci près que les cellules restent accolées, une seconde division s'opère pour l'une d'elles lors de laquelle une cellule fille « bourgeoine » dans le

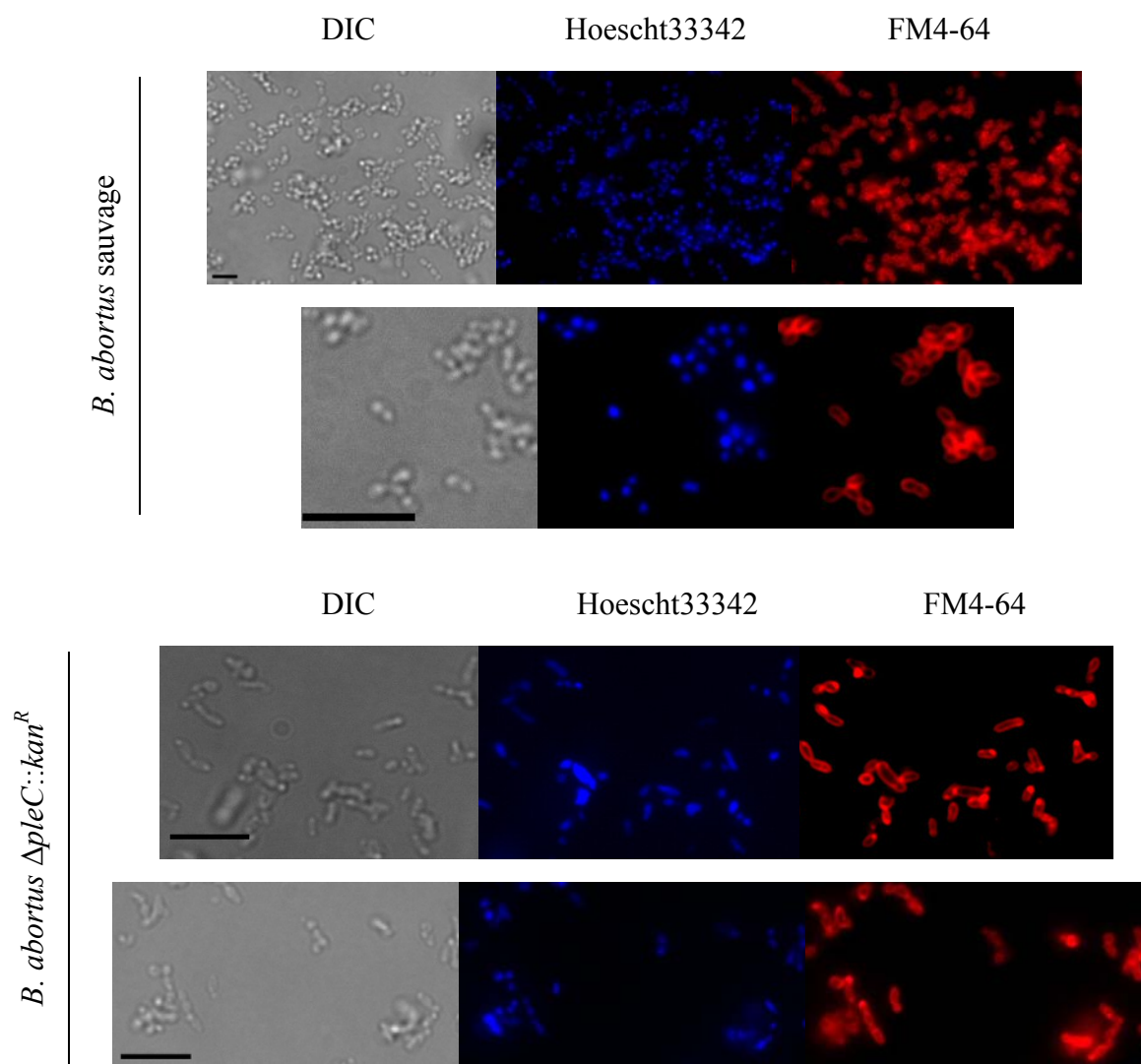
plan de l'ancien septum. Une deuxième apparence radicalement aberrante brandit de multiples ramifications. Potentiellement, elle représenterait une triade ayant subi maintes divisions. Pour finir, un nombre important de bactéries se rassemblent en « chapelet », phénotype étrangement similaire au mutant de surexpression *divJ* (voir fig. 18 de l'introduction page 19). En ce qui concerne le mutant  $\Delta divJ$ , son phénotype est beaucoup moins prononcé comparé à celui de  $\Delta pleC$ . Excepté une très légère tendance à former des « chapelets », ce mutant ne semble pas avoir de problème morphologique sérieux.

### Étude approfondie : double marquage

Le triple phénotype auquel nous assistons nous a conduits à considérer l'impact de *PleC* sur la division en général et la formation du septum en particulier. Assurément, le phénotype en « chapelet » immisce l'éventualité d'un défaut de complétude de division (e.g. septa incomplets). Il est tout à fait possible que cette visualisation des bactéries agencées en file indienne ne soit en réalité qu'un long filament composé d'une unique bactérie affublée de constriction septales inachevées. Pareillement, la scissiparité est en relation avec la ségrégation du ou des chromosome(s) et il est pertinent de s'attarder sur leur distribution au sein d'une bactérie où la division est perturbée.

Pour mettre en œuvre cette expérience, deux molécules fluorescentes sont à notre disposition (Molécular Probes). Le Hoescht33342 marque les polymères désoxyribonucléotidiques, spécifiquement sur l'adénine et la thymine, et émet un rayonnement de longueur d'onde correspondant au bleu. Le FM4-64, vu son caractère lipophile, se loge sur le feuillet externe de la membrane sans pénétrer le cytoplasme marquant de cette manière le pourtour de la cellule. Sa longueur d'onde d'émission correspond au rouge-orange. Des tests préliminaires ont défini la concentration de ces deux molécules qui conduit à un rapport signal/bruit maximal. Pour les deux fluorophores, elle est de 5  $\mu\text{g/ml}$ .

La manipulation se déroule comme suit : à partir de milieux de sélection  $\text{NaI}^R$  ;  $\text{Kan}^R$  (boîte de Pétri) sur lesquelles ont été étalés un souche sauvage et le délétant, nous raclons parcimonieusement, à l'aide d'une anse, un amas bactérien que nous resuspendons dans 500  $\mu\text{l}$  d'une solution contenant les deux marqueurs fluorescents. Nous incubons le tout à 37°C pendant 10 minutes. La suite est connue. Nous transvasons les 500  $\mu\text{l}$  dans un puits (plaque 24 puits) muni d'un coverslip activé à la poly-L-lysine pendant 1 heure à 37°C et nous centrifugeons 10 minutes à 1000 rpm. Nous lavons trois fois au PBS et nous fixons les bactéries au PFA 4%. Après 20 minutes, nous lavons au PBS. Nous transférons les coverslip's de la plaque 24 puits dans une autre plaque stérile par mesure de sécurité. En dehors du BL3, nous immobilisons sur une lame les bactéries avec un antifading (Dako®) pendant minimum 3 heures à l'obscurité. Il nous reste alors à observer les coupes sous microscope à épifluorescence (Fig. 18).



**Fig. 18.** Micrographies en épifluorescence de *B. abortus*. Pour les deux souches, sauvage et  $\Delta pleC$ , nous visualisons la morphologie générale des bactéries en contraste de phase (DIC), l'ADN grâce à l'Hoescht33342 (en bleu) et la membrane grâce au FM4-64 (en rouge). La barre micrométrique équivaut à 2  $\mu m$ .

À nouveau, les conclusions tirées sur base de ces marqueurs sont purement de nature qualitative dans ce cadre d'observation. Dans une optique quantitative, l'étude en cytométrie de flux nous aurait renseignés notamment sur la quantité d'ADN, et donc indirectement sur le nombre de chromosomes, présente par cellule.

Concernant le marquage d'ADN, nous remarquons que les boules parfaitement proportionnées chez la sauvage se métamorphosent en taches effilées et parfois informes chez le délétant. Si nous considérons que l'ADN n'est pas exclu de certaines zones cytoplasmiques et qu'il occupe en temps normal tout l'espace disponible, ce fait confirme l'impact de PleC sur la morphologie bactérienne. En revanche, il est ardu de se prononcer, que ce soit dans un sens ou dans l'autre, sur l'hypothèse qu'une ségrégation inégale s'opère lors de la scissiparité.

Néanmoins, il semble que, pour des bactéries en division, l'ADN se retrouve de part et d'autre de la constriction septale. Cette donnée à confirmer inévitablement, écarterait PleC d'une implication dans la réplication et/ou dans la ségrégation des chromosomes.

Les résultats relatifs au marquage de la membrane externe sont difficilement exploitables. Néanmoins ces micrographies exhibent une particularité intrigante. Pour une majorité de cellules, qu'elles soient triadiques, filamenteuses, aberrantes ou quasi normales, un point lumineux plus intense apparaît à l'un des deux pôles. Si le FM4-64 s'accumule à cet endroit précis, c'est, semble-t-il, parce que des constituants membranaires s'y amoncellent justement. Étant donné le mode d'action de la molécule (pas de pénétration du cytoplasme), cet amas de lipides est en continuité avec la membrane.

## Discussion

L'accumulation polaire de matériel lipophile dans le mutant *pleC* pourrait correspondre à une invagination de la membrane au pôle, un septum positionné à un endroit inapproprié. La meilleure stratégie pour confirmer cette hypothèse serait de visualiser directement le positionnement de l'anneau Z, par exemple en construisant une fusion traductionnelle entre FtsZ, protéine essentielle à l'échafaudage de l'anneau Z et donc du septum, et la GFP.

Avant de poursuivre la caractérisation des phénotypes de  $\Delta pleC$  et  $\Delta divJ$ , il est impératif de tenter une complémentation, notamment via le pMR10-*cat-pleC* pour  $\Delta pleC$  et le pMR10-*cat-divJ* pour  $\Delta divJ$  (gènes sous contrôle du *Plac*). Cette étape nous autorisera définitivement à considérer ces délétions comme seuls responsables de tous les phénotypes « anormaux ». En sachant que la souche est irrémédiablement débarrassée du gène *pleC* (ou *divJ*), il est plausible qu'une mutation secondaire, soit présente dès le départ, soit favorisée par l'absence de *pleC* (*divJ*), provoque seule les phénotypes du mutant. Dans l'éventualité où la complémentation ne donnerait pas les résultats escomptés, nous devrions alors penser à compléter avec le gène *pleC* (*divJ*) sous contrôle de son promoteur natif et de préférence dans un contexte chromosomique. Cette étape devra s'appliquer nécessairement aux autres délétants une fois ceux-ci à notre disposition.

Dans un premier temps post-complémentation, il serait intéressant de préparer ces délétants pour l'observation en microscopie électronique à balayage d'une part pour confirmer et préciser les phénotypes observés en Gram, et d'autre part pour tenter de découvrir d'autres phénotypes imperceptibles en microscopie photonique. En parallèle, une analyse quantitative, par exemple du marquage d'ADN, via la cytométrie de flux ou le FACS, serait à envisager.

Étant donné les outils en notre possession (voir chapitre précédent) et la prédiction de localisation de la protéine délétée, il serait pertinent d'observer le comportement de ces protéines en fusion avec une étiquette fluorescente au sein d'une souche débarrassée de la copie sauvage du gène correspondant évitant toutes interférences potentielles entre protéines sauvage et chimérique. Le pMR10-*cat-pleC-gfp* et le pMR10-*cat-divJ-gfp* apparaissent comme des outils puissants d'accès aisé.

Un moyen d'éclairer partiellement la nature fonctionnelle de PdhS et de confirmer les rôles concurrents de DivJ et PleC serait de tenter une suppression par dosage génique, c'est-à-dire d'insérer un plasmide de surexpression, e.g. un pBBR1-*cds*, d'un autre gène du pathway CtrA dans la souche délétée. Deux cas de figure se présenteraient : soit une aggravation du phénotype, conduisant vraisemblablement à la mort bactérienne, soit une restauration partielle

ou totale du phénotype sauvage. Les fonctions présumées seront alors respectivement similaires et antagonistes.

Un mot concernant les problèmes rencontrés : l'impossibilité de déléter un gène peut venir tout autant de l'essentialité de ce gène que de problèmes relatifs à une double recombinaison intervenant à ce locus. Dévier légèrement notre stratégie et tenter d'obtenir des disruptants - CDS sectionnées par une cassette de résistance (insertion dans le chromosome via un unique événement de recombinaison)- constitue une solution de remplacement.

# Conclusions générales et perspectives

*A* droite, *Caulobacter*, bactérie ubiquiste à deux visages érigée en paradigme du cycle cellulaire. À gauche, *Brucella*, procaryote et pathogène facultatif de mammifères quasiment éradiqué en Europe. Tout paraît séparer ces deux organismes appartenant à la classe des  $\alpha$ -protéobactéries. Tout ! Et pourtant, un système de signalisation capital à la marche coordonnée du cycle de division constitue un point commun substantiel. Au sein de ce système, CtrA, régulateur central, agit comme un véritable goulot d'étranglement en assimilant les diverses informations relatives à la division par le truchement d'acteurs appartenant au système à deux composants et en transmettant la réponse *ad hoc* via le contrôle des gènes requis pour l'établissement de celle-ci. En raison de cette similitude, *Caulobacter*, procaryote étudié sous toutes les coutures, nous fournit un excellent modèle pour appréhender, chez *Brucella*, les réseaux dont les acteurs sont conservés chez les deux espèces. Néanmoins, le paradigme *Caulobacter* reste pour *Brucella* un modèle prédictif, théorique et il est impératif d'éprouver les fonctions associées à chaque protagoniste chez *Brucella*.

De manière récapitulative, les expériences réalisées lors de ce mémoire ont dégagé essentiellement deux informations. Primo, les fusions promoteur-*gfp* ont révélé l'activité du promoteur des gènes encodant les cinq protéines à caractère régulateur, DivJ, DivK, DivL, PdhS et PleC, que ce soit au cours de la vie libre ou au cours du cycle infectieux. En postulant qu'un organisme vivant transcrit uniquement les gènes dont le produit protéique est nécessaire dans une condition donnée, cette observation nous imposera donc dans le futur de s'intéresser à toutes ces protéines, dans un cadre de localisation, de transcription, d'activité, etc., sans écarter l'un des deux styles de vie de la bactérie. Secundo, grâce à l'obtention du délétant *pleC*, nous avons apprécié les problèmes morphologiques et, semble-t-il, divisionnels impliqués par l'absence de PleC. Il vient à l'esprit que l'accumulation de matériel lipidique à un pôle de la cellule (donnée tirée de l'expérience du double marquage ADN- membrane) traduirait une septation réalisée à un endroit inapproprié. Cette hypothèse exige inévitablement confirmation. Néanmoins, si elle s'avérait, PleC régulerait le positionnement du septum dont nous savons qu'il est contrôlé par MinC chez d'autres bactéries, e.g. *E. coli*. En rappelant que *minC* est une cible présumée de CtrA chez *Brucella*, nous sommes en mesure d'expliquer le phénotype observé dans le mutant *pleC* en imaginant que PleC contrôle CtrA qui à son tour contrôle *minC*. Alternativement, une seconde hypothèse, non exclusive par rapport à la précédente, peut être exprimée. Nous avons observé lors du marquage de l'ADN (données toujours issues de l'expérience du double marquage) que, dans le délétant *pleC*, des taches informes se substituaient aux sphères régulières de la sauvage, ceci mettant en lumière une perturbation de la structure du nucléoïde. Or selon la théorie de la « nucleoid occlusion », le septum s'agence au seul endroit où l'ADN ne crée pas d'encombrement stérique, c'est-à-dire soit aux pôles, soit au milieu des chromosomes ségrégués, autrement dit dans le plan transversal (légèrement excentré chez *Brucella*) de la cellule. Étant donné qu'aux pôles MinC inhibe la polymérisation de FtsZ (et par extension la structuration de l'anneau Z), le septum n'a d'autre endroit que le plan transversal pour s'établir. En intégrant cette information au phénotype du délétant *pleC*, il est tout à fait plausible que les paires de chromosomes forment une masse insécable occupant la totalité du cytoplasme, forçant l'anneau Z à outrepasser l'inhibition de MinC et à se loger aux pôles.



Outre des considérations à caractère relativement théorique, ce travail a contribué à l'élaboration d'outils pratiques tantôt biologiques (délétants), tantôt plasmidiques. Exploitable chacun selon des modalités différentes, ils représentent un point de départ, une base pour une multitude d'autres recherches et études consacrées au pathway CtrA en particulier et à la localisation en général. À titre d'exemple, observer les patterns de distributions d'une protéine dans une souche délétée pour un gène encodant une seconde protéine revêt une importance considérable dans la dissection des processus de localisation. De manière pragmatique, il serait intéressant de se pencher, dans un premier temps, sur la localisation du régulateur de réponse dans des souches délétées pour ses partenaires histidine-kinases et, dans un second temps, d'étendre le champ d'investigations sur les histidine-kinases entre-elles. Toujours en vue d'exploiter les outils dorénavant disponibles, les délétants *pleC* et *divJ* pourraient être étudiés pour des phénotypes plus précis tels que la phosphorylation de DivK *in vivo*, ou encore l'impact de l'absence de PleC sur le flagelle, en songeant notamment à la rigidité et à la non-éjection de cette organelle rencontrées dans le mutant *pleC* chez *C. crescentus*. Sans vouloir s'écarter trop du sujet, il est à préciser que, chez cette espèce paradigmatique, la relation PleC – flagelle semble transiter par la fonction de PleD (régulateur de réponse encodé par un gène en opéron avec *divK*) et pas par celle de CtrA. L'obtention d'un mutant PleD serait donc aussi d'un tout grand intérêt pour la compréhension du rôle endossé par PleC.

En ce qui concerne PdhS, protagoniste nouveau en regard du pathway CtrA de *Caulobacter*, un grand flou subsiste. Son intérêt, outre sa présence restreinte à la famille rhizobiale, réside dans la fonction de son énorme domaine cytoplasmique (approximativement 800 acides aminés) dont aucun (sous-)domaine de fonction présumée n'a pu être mis en évidence. D'autres stratégies peuvent être envisagées en complémentarité avec une approche génétique de délétion ou de disruption. Pour n'en citer qu'une, nous pourrions tester des domaines de PdhS en double hybride avec une banque génomique qui place des fragments de CDS de *Brucella* en fusion avec un domaine d'activation de la transcription chez la levure. Parmi les interacteurs de PdhS, nous espérons harponner soit un substrat protéique, soit une protéine fournissant une information positionnelle.

Encore énormément d'investigations devront être menées, de casse-têtes démantelés, de sueurs versées sur CtrA et les nombreuses protéines que ce régulateur central engage, indépendamment de l'organisme qui les accueille. Cela signifie non seulement parfaire le modèle en peaufinant les connaissances relatives aux fonctions qui incombent aux acteurs protéiques déjà décrits dans la littérature, pensons spécialement à DivL dont des études de localisation *in vivo* seraient en mesure d'apporter une pierre supplémentaire à l'édifice CtrA, mais aussi en isolant de nouveaux protagonistes du pathway dans les nombreuses protéines hypothétiques prédites suite à l'annotation des génomes de *Caulobacter* et de *Brucella*. Signalons plus concrètement que récemment un régulateur global essentiel dénommé GcrA, fonctionnellement antagoniste de CtrA et qui le régule transcriptionnellement, a été découvert chez *Caulobacter* et est conservé chez *Brucella* <sup>(Holtzendorff *et al.*, 2004)</sup>.

De la confrontation entre les modèles de *Caulobacter* et de *Brucella* (sans oublier ceux des autres  $\alpha$ -protéobactéries), bactéries au style de vie radicalement opposé, résultera sûrement une vision plus élaborée des processus sélectifs internes chez un être vivant. Elle nous aidera à comprendre dans quelle mesure deux systèmes biologiques soumis à deux pressions de sélection différentes adaptent leur comportement tout en préservant un noyau régulateur essentiel commun. Bien entendu, avant d'arriver à cette étape, il est nécessaire, chez *Brucella*, de recadrer, dans un contexte de virulence, le réseau prédit à partir de *Caulobacter*, et pourquoi pas, d'identifier des signaux spécifiques ressentis par les histidine-kinases.

En définitive, le paradigme *Caulobacter* nous transporte au travers d'un principe cher aux biologistes : l'émergence. Cet être procaryote est le témoin patent qu'un organisme dans sa globalité revêt une plus grande importance face à la somme de ses parties individuelles. Il nous illustre la manière dont, à partir de deux entités biologiques distinctes - cellules flagellées et cellules stalkées -, naît un troisième terme - la population entière - qui les unit et sur lequel s'exerce la pression de sélection darwinienne. Il nous emporte sur les sentiers de la différenciation et nous indique que ses parents phylogénétiques semblent adopter un processus identique quoique présentant des phénotypes plus discrets.

Tout compte fait, les études appréhendant le canevas de différenciation de *Caulobacter*, enrichies des canevas de *Brucella* et d'autres  $\alpha$ -protéobactéries voire de bactéries d'autres classes taxonomiques, n'ont-elles pas aussi pour objectif d'exploiter les notions de différenciation procaryote, d'en extirper une information, un concept, un fondement qui serait d'application pour éclairer les principes sublimant un être pluricellulaire eucaryote, et surtout, par anthropocentrisme, un être humain ?

# Matériel et méthodes

# Matériel et méthodes

## Souches et plasmides

### Souches

#### ***Escherichia coli* DH10B**

Cette souche est utilisée pour l'amplification d'un plasmide ou d'un produit de ligation. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne. Génotype : F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*ΔM15 D*lacX*74 *deoR* *recA1* *endA1* *araD*139 D (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* l- *rpsL* *nupG*.

#### ***Escherichia coli* S17-1λpir**

Cette souche possède le plasmide RP4 intégré dans son génome qui lui permet de transférer par conjugaison un plasmide pourvu d'une origine de transfert. De plus, elle est résistante à la streptomycine et au triméthoprim. Génotype : *recA* *thi* *pro* *hsdR*<sup>-</sup> M<sup>+</sup> RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenized with λpir phage.

#### ***Escherichia coli* DB3.1**

Cette souche résistante à la toxine CcdB grâce à un allèle *gyrA*462 est utilisée par l'amplification de plasmide gateway<sup>TM</sup>. Génotype : F- *gyrA*462 *endA*-D(*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsd20*(*rB*-,*mB*-) *supE*44 *ara*14 *galK*2 *lacY*1 *proA*2 *rpsL* l- *leu* *mtl*1.

#### ***Brucella abortus* 544**

La souche de référence utilisée tout au long de ce travail est *B. abortus* biovar 544, phénotype lisse, rendue résistante à l'acide nalidixique (Nal<sup>R</sup>) au laboratoire de biologie moléculaire, FUNDP, Namur.

### Plasmides

#### **pSKoriT**

Ce plasmide est un dérivé de pBluescript SK (Stratagene) dans lequel une origine de transfert conjugatif oriT a été clonée. Il porte le gène *bla* (résistance à l'ampicilline) et une origine de réplication ColE1 (origine non fonctionnelle chez *Brucella* ; c'est donc un plasmide non réplcatif chez cette bactérie).

#### **pSKoriT-*cat***

Mêmes remarques que concernant le pSKoriT à ceci près que le gène *bla* est disrupté par le gène *cat* (résistance au chloramphénicol).

**pKSoriT**

Mêmes remarques que concernant le pSKoriT à ceci près qu'il dérive du pBluescript KS.

**pMR10-cat**

Le pMR10-*cat* est un plasmide réplcatif chez *Brucella* spp. à faible nombre de copies (origine RK2oriV), possédant un gène de résistance à la kanamycine et un gène de résistance au chloramphénicol.

**pUC4K**<sup>(Oka *et al.*, 1981, Vieira and Messing, 1982)</sup>

Ce plasmide fourni par la firme Amersham biosciences encode le gène de résistance à la kanamycine (*kan<sup>R</sup>*) pourvu de son promoteur, disruptant le gène *lacZ'*. Il contient aussi le gène *bla* et une origine de réplcation dérivée du pBR322.

**pFA6-*gfp***<sup>(Bahler *et al.*, 1998)</sup>, **-*cfp*, -*yfp***

Ces trois plasmides comportent un gène encodant une protéine fluorescente (respectivement la GFP, CFP, YFP). En outre, il est réplcatif chez les bactéries et possède un gène *bla* et un gène *kan<sup>R</sup>*.

**pMR10-gateway**

Ce plasmide est dérivé du pMR10-*cat*, auquel ont été rajoutés, à proximité du promoteur *Plac*, des sites *attR1* et *attR2* compatibles Gateway de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB*, toxique pour certaines souches de *E. coli*, ainsi qu'un gène de résistance au chloramphénicol (Régis Hallez, thèse en cours). Ces sites permettent l'échange de la cassette avec un fragment d'ADN d'intérêt présent dans un vecteur donneur via une réaction LR. *In fine*, nous obtiendrons une fusion transcriptionnelle entre le *Plac* et la séquence codante insérée.

**pBBR1-gateway**

Dérivé du pBBR1 MCS-1<sup>(Kovach *et al.*, 1995)</sup>, ce plasmide a été rendu compatible au système gateway à la manière du pMR10-gateway (Régis Hallez, thèse en cours) et possède une origine de réplcation REP.

**pBBR1-*gfp***<sup>(Ouahrani-Bettache *et al.*, 1999)</sup>

Ce plasmide de 6640 pb, possède le gène *bla* ainsi qu'une origine de transfert appelée oriT. Il contient également l'origine de réplcation REP, qui est compatible avec la machinerie de réplcation de *Brucella*. Il contient par ailleurs un gène encodant la GFP et dépourvu de promoteur. Ce plasmide à taux moyen de réplcation (10 à 15 copies par cellules) permet l'étude de l'induction de promoteurs.

**pDONR201**

Ce plasmide commercialisé par Invitrogen est conçu pour le clonage en système Gateway de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *attP1* et *attP2* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* et un gène de résistance au chloramphénicol. Le plasmide porte en outre un gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplcation (pUC ori) chez *E. coli*. Il est utilisé dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt muni de sites *attB1* et *attB2*, résultant en un vecteur d'entrée.

## Milieux et solutions

### Milieux de culture

Tous les milieux de culture sont à autoclaver (121°C pendant minimum 20 minutes) avant utilisation.

#### Milieux riches pour *E. coli* : milieu Luria Bertani (LB)

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Hydrolysate de caséine (peptone)	10 g	10 g
NaCl	5 g	5 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	15 g

#### Milieux riches pour *Brucella abortus* : milieu 2YT

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
Mix pour LB liquide	20 g	35 g
Hydrolysate de caséine (peptone)	6 g	6 g
Yeast extract	5 g	5 g
Agar	-	1 g

### Solutions

#### PBS 20X

Pour un litre d'eau désionisée	Pesée
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2mM	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM	28,2 g
KCl 2,7 mM	4 g
NaCl 137 mM	160 g

À diluer 20 fois avant son utilisation, sans oublier d'amener à pH 7,4.

#### Antibiotiques et consorts

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)
Acide nalidixique	Nal	NaOH 0,2N	25 mg/ml
Ampicilline	Amp	H <sub>2</sub> O	100 mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Ethanol 100%	20 mg/ml
Kanamycine	Kan	H <sub>2</sub> O	50 mg/ml
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	IPTG	Ethanol 70%	100 mM

5-bromo-4-chloro-3-indoyl- βD-galactopyranoside FM4-64 Hoescht33342	X-gal	Diméthylformamide  H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	2 mg/ml  5 mg/ml 5 mg/ml
--	-------	---	-----------------------------------

Toujours filtrer stérilement avec un filtre 0,22 µm de porosité avant d'aliquoter. Ne pas oublier de diluer 1000 fois lors de l'utilisation dans un milieu.

## Techniques relatives à l'ADN

### Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Les séquences bordant le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers) qui leur sont complémentaires. La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools ou l'Expand High Fidelity de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. La *Taq* polymérase, vu le taux relativement élevé de mutations introduites, est utilisée dans les cas de PCR diagnostiques alors que la High Fidelity est utilisée dans les cas de clonage. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

#### Mix

Réactifs	Quantité
Tampon 10X correspondant à l'enzyme	5 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	4 µl
Primer 1 (20 µM)	1 µl
Primer 2 (20 µM)	1 µl
Taq polymérase ou High Fidelity	0,5 µl
Template	~20 ng
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl

Lors d'une PCR dont les amorces sont bordées de site de recombinaison GW<sup>TM</sup> (*attB1* ou *attB2*), la concentration des primers utilisés n'est plus de 20 mais de 100 µM.

#### Programme

1. Dénaturation de 5 minutes à 94°C.
2. 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :
  - a. 30 secondes (ou 1 minute pour une amplification de fragments compatibles GW<sup>TM</sup>) à 94°C pour dénaturer.
  - b. 30 secondes (même remarque que pour le point a) à X°C pour hybrider où X = Tm-10°C

c. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kpb) du fragment à amplifier.

### 3. Elongation finale de 10 minutes à 72°C

La température de melting ( $T_m$ ) des amorces de moins de 20 pb égale le quadruple de la somme des bases G et C additionné du double de la somme des bases A et T. En bref, la  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence exotique en 5'.

Remarquons que l'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

## Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Comme marqueur de tailles, nous utilisons l'HyperLadder de Bioline. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

### Fabrication du gel

1. Dissoudre par chauffage Y g d'agarose dans Z ml de tampon TAE 1X, où Y/Z représente le pourcentage en agarose.
2. Ajouter 5 µl de bromure d'éthidium.
3. Une fois que la température du flacon permet de le tenir en main (~60°C), couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits.
4. Charger les échantillons auxquels a été ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur, sans oublier de charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 µl/puits).

Bromure d'éthidium	Solution d'alourdisseur	Tampon TAE 50x
Solution de 2mg/ml H <sub>2</sub> O	glycérol 50% EDTA 100mM SDS 1% Bleu de bromophénol ou méthyl orange	Tris-HCl pH 8,0 40mM EDTA 50mM Acide acétique glacial 57,1ml/litre

## Restriction sur plasmide

- 1 µl Buffer 10X (3 µl pour le Southern blot) en fonction de l'enzyme (A, B, L, M ou H).
- 1 µl d'enzyme de Restriction (enzyme concentrée 5X pour un Southern blot).
- X µl de plasmide,
- Porter à un volume final de 10 µl (30 µl pour un Southern blot) avec de l'eau distillée.

Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C. Les enzymes de restriction et leur tampon proviennent de chez Roche.



Enzyme	Site	Tampon	Enzyme	Site	Tampon
<i>Asp</i> 718	G/GTACC	B	<i>Nco</i> I	C/CATGG	H
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	A, B ou M	<i>Pvu</i> II	CAG/CTG	L
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	A, B, M ou H	<i>Sac</i> I	GAGCT/C	A
<i>Eco</i> R I	G/AATTC	A, B ou H	<i>Sma</i> I	CCC/GGG	A
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	B	<i>Ssp</i> I	AAT/ATT	H
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	B ou M	<i>Xba</i> I	T/CTAGA	A ou H
<i>Hpa</i> I	GTT/AAC	A	<i>Xho</i> I	C/TCGAG	H

## Ligation d'un plasmide

Réaction réalisée pendant 2 heures à température ambiante (sur la paillasse), volume final jamais supérieur à 20 µl.

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/1 pour un clonage directionnel et 1/3 pour un non directionnel.
- 4 µl de Tampon 5X T4 DNA Ligase.
- 1 µl de T4 DNA Ligase.
- Porter à volume final (20 µl) avec de l'eau.

## Purification sur gel

Suivre le protocole du QIAquick™ Gel Extraction Kit de Qiagen. Ce protocole est prévu pour extraire et purifier de l'ADN de 70 bp à 10 Kpb à partir d'un gel d'agarose standard.

## Purification sur colonne

Suivre le protocole du High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche. Ce protocole est prévu pour purifier des fragments d'ADN simple ou double brin de réactions PCR ou d'autres réactions enzymatiques.

## Minipréparation de plasmide

Lancer une culture de 5 ml de LB additionnée ou non d'antibiotique(s). Suivre les instructions du kit Nucleospin® (Marcherey-Nagel). Ce protocole est employé pour purifier environ 20 µg d'ADN plasmidique.

## Midipréparation de plasmide

Lancer une culture de 100 ml de LB additionné ou non d'antibiotique(s). Suivre les instructions du kit Nucleobond® (Marcherey-Nagel).

## Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'ondes bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

### Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube de 100 µl :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles de primer.
- Ajouter 2 µl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- Ajouter 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl<sub>2</sub>.
- Amener le volume final à 20 µl avec de l'eau distillée.

### Cycles

1. Dénaturation de 1 minute à 96°C.
2. 25 cycles de :
  - a. 10 secondes à 96°C.
  - b. 10 secondes à 50°C.
  - c. 4 minutes à 60°C.
3. Maintenir à 4°C ou stocker à -20°C.

## Clonage Gateway™

Le système Gateway™ est basé sur les réactions de recombinaison intervenant lors de l'intégration et de l'excision du phage λ dans le génome d'*E. coli*. L'intégration implique la recombinaison entre les sites *attP* et *attB* présents respectivement dans l'ADN du phage λ et dans le génome bactérien. Cette réaction génère un génome phagien intégré compris entre les sites *attR* et *attL* néoformés. La réaction d'intégration (réaction BP) requiert deux enzymes : l'intégrase (Int) encodée par le génome du phage ainsi que l'IHF (Integration Host Factor) d'origine bactérienne communément appelée BP clonase. Cette intégration est réversible et l'ADN du phage peut être excisé du génome bactérien par recombinaison entre les sites *attR* et *attL*. Cette réaction d'excision est appelée réaction LR. Elle nécessite les facteurs Int et IHF ainsi qu'une protéine additionnelle d'origine phagique (Xis) communément appelée LR clonase. Ce système a été adapté de sorte à permettre des clonages faciles en laboratoire Fig. 19). La perte d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches de *E. coli* lors des recombinaisons est un moyen de sélection des clones recombinants.

Réaction BP artificielle	Réaction LR artificielle
1 µl (150 ng) de pDONR201 restreint NcoI 3 µl de réaction PCR du gène d'intérêt 2 µl de tampon de dilution BP 2 µl d'enzyme clonase BP 2 µl d'H <sub>2</sub> O distillée Placer à 25°C de 2 à 24h, puis stopper la réaction en incubant 10 min. à 37°C avec 2 µl de protéinase K	3 µl de vecteur d'entrée 3 µl de vecteur de destination 2 µl de tampon de dilution LR 2 µl d'enzyme clonase LR  Placer à 25°C de 2 à 24h.

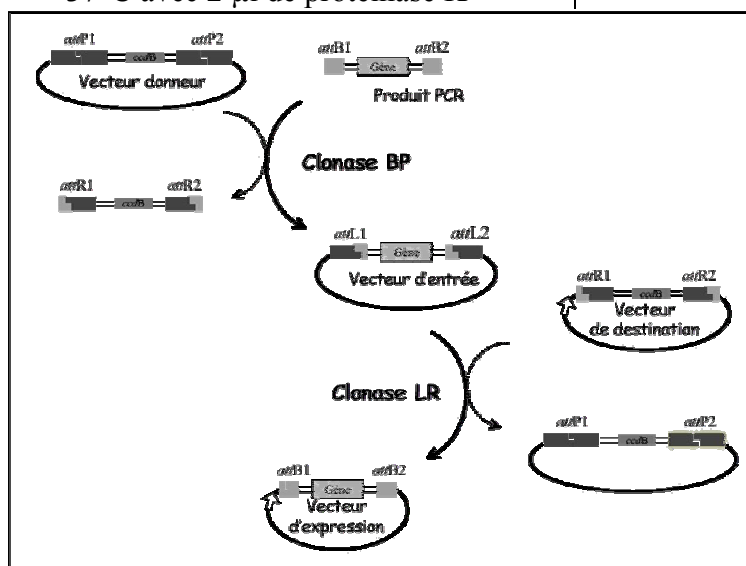


Fig. 19. Schéma des réactions BP et LR du système Gateway<sup>TM</sup>. (Lurin, 2001)

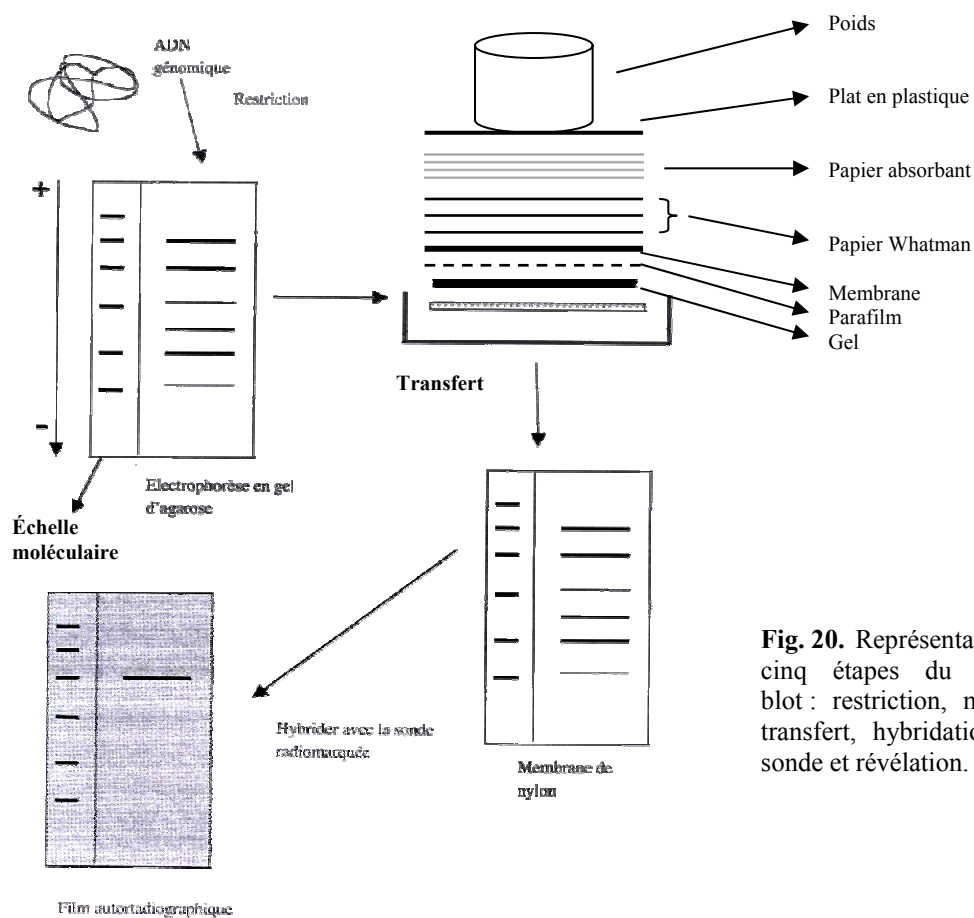
## Extraction d'ADN génomique

1. En utilisant une anse, prélever des bactéries sur milieu solide et les resuspendre dans 567 µl de TENa (en eppendorf).
  2. Ajouter 30 µl de SDS 10% et 3 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
  3. Homogénéiser en inversant doucement l'eppendorf et incubé à 37°C pendant 1 heure.
  4. Ajouter 600 µl de phénol saturé en tampon TENa, et agiter fortement l'eppendorf.
  5. Centrifuger 20 minutes à 4 °C à 13500 rpm.
  6. Récupérer la phase aqueuse supérieure sans emporter le voile à l'interface.
  7. Ajouter 80 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M et 600 µl de chloroforme, agiter fortement.
  8. Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
  9. Récupérer la phase aqueuse et ajouter 1 ml d'éthanol 100% conservé à -20°C.
  10. Mélanger en inversant l'eppendorf.
  11. Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 13500 rpm.
  12. Eliminer le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70% conservé à -20°C.
  13. Centrifuger 10 minutes à 13500 rpm et éliminer le surnageant.
  14. Sécher sous vide et resuspendre dans 100 µl d'eau distillée stérile.
  15. Pour faciliter la resuspension, incubé l'eppendorf à 37°C.
- Pour 500 ml de tampon TENa : 3,03 g de Tris 50 mM à pH 8 ; 9,31 g d'EDTA (50 mM) ; 2,92 g de NaCl (0,1 M).

## Southern blot

Le Southern blot est une technique d'identification et de localisation de séquences spécifiques d'ADN. Elle tire parti de la propriété qu'a l'ADN de former des structures en duplex stables, stabilité en relation directe avec la complémentarité des deux brins d'ADN. Le procédé utilise des sondes d'ADN, marquées radioactivement dans notre cas, qui vont s'hybrider avec les séquences d'intérêts.

Dans cette méthode, l'ADN est digéré par une enzyme de restriction et les fragments d'ADN bicaténaires sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose de façon à séparer les fragments selon la taille. Les fragments d'ADN sont visualisés grâce aux UV et dénaturés par incubation du gel dans une solution de dénaturation d'hydroxyde de sodium. Le gel est ensuite immergé dans un bain de neutralisation. Les fragments d'ADN sont transférés sur une membrane de nylon grâce à un transfert effectué par capillarité. On obtient donc une réplique en miroir du gel sur le film. L'ADN est ensuite fixé de manière covalente à la membrane de nylon par exposition aux UV. L'hybridation de la sonde d'acide nucléique radiomarquée à l'ADN dénaturé et restreint fixé sur la membrane de nylon (Marcheney-Nagel) s'effectue dans des conditions de stringence données, après élimination par lavage de l'excès de sonde non fixée à la membrane. La sonde hybridée au fragment d'ADN est décelée par autoradiographie de la membrane. La position à laquelle s'est effectuée l'hybridation spécifique de la sonde est donnée par un marqueur de tailles (Fig. 20).



**Fig. 20.** Représentation des cinq étapes du Southern blot : restriction, migration, transfert, hybridation de la sonde et révélation.

## Restriction de l'ADN génomique

- Prendre 6 µl d'ADN génomique resuspendu dans de l'eau distillée.
- Ajouter 1.5 µl d'enzyme concentré (*Hind* III, *Eco*R I ou *Ssp* I).
- Ajouter 3 µl de tampon de restriction 10x associé à l'enzyme.
- Mettre à un volume de 30 µl avec de l'eau distillée stérile.
- Incuber une nuit à 37 °C.

## Électrophorèse en gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN restreint est réalisée dans un gel d'agarose de 1 %. Le marqueur de tailles HyperLadder (Bioline) est utilisé pour évaluer la taille des fragments de restriction.

## Transfert sur membrane et immobilisation

- Après l'électrophorèse, exposer indirectement le gel d'agarose aux UV (302 nm) afin de le photographier.
- Immerger le gel dans la solution de dénaturation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Immerger le gel dans la solution de neutralisation pendant 2x 20 minutes, sous faible agitation.
- Découper un morceau de membrane de nylon chargée positivement de taille un peu supérieure à celle du gel.
- Par un montage de transfert, l'ADN est transféré sur la membrane en présence de SSC 20X overnight (voir schéma ci-dessus).
- Après le transfert, sécher la membrane entre deux feuilles de papier Whatman.
- Incuber la membrane à 80 °C pendant 120 min et immobiliser l'ADN sur la membrane, en l'exposant aux UV pendant 5 secondes.

Solution de dénaturation	Solution de neutralisation	SSC 20X
NaCl 1 M NaOH 0.5 M	NaCl 1.5 M Tris HCl 0.5 M pH 7.2 EDTA 1 mM	NaCl 3 M Na <sub>3</sub> citrate 0.3 M

## Préhybridation

La membrane est immergée dans une solution de préhybridation pendant 30 minutes à 65°C. Ceci permet de réduire le bruit de fond en hybridant de manière non-spécifique la membrane avec de l'ADN non marqué de thymus de veau. Les 50 ml de solution sont préparés comme suit :

Denhard 50X	SSC 20X	SDS 10 %	ADN de thymus 100 µg / ml	H <sub>2</sub> O
5 ml	12.5 ml	0.5 ml	2 ml	30 ml

L'ADN de thymus de veau est dénaturé dans de l'eau bouillante pendant 10 min. et incubé sur glace.

## Marquage de la sonde et hybridation

Le fragment d'ADN utilisé comme sonde est dénaturé et mis en présence de primers aléatoires. Une synthèse d'ADN est initiée par la polymérase Klenow, en incorporant des nucléotides dont le dCTP est marqué radioactivement par son  $\alpha^{32}\text{P}$ .

- Porter environ 25 ng d'ADN sonde à un volume finale de 10 µl avec de l'eau stérile.
- Faire bouillir pendant 5 min., faire un quick spin et ensuite conserver sur glace.
- Ajouter 1 µl de dATP, dGTP, dTTP et 20 µl de random primers (solution 2.5x).
- Ajouter 5 µl de dCTP marqué au  $^{32}\text{P}$  et ajouter 11 µl d' $\text{H}_2\text{O}$ , mélanger.
- Ajouter 1 µl de Klenow et faire un quick spin.
- Incuber 10 min. à 37°C.

La membrane est ensuite incubée avec la sonde dans la solution de préhybridation, pendant une nuit, à 65 °C.

### Détection

Après hybridation, le mélange préhybridation-sonde peut être récupéré et conservé à -20 °C pour être réutilisé. La membrane est lavée deux fois, pendant 10 minutes, avec du SSC 20X SDS 0.1 %.

La membrane est ensuite placée, sous farde plastique, dans une cassette avec un film autoradiographique. La cassette est maintenue à -80 °C pendant au moins cinq heures. Ensuite, le film autoradiographique est immergé dans une solution de révélation pendant 30 à 60 secondes. Quand les bandes sont révélées, le film est trempé dans une solution de fixation, puis rincé dans de l'eau.

## Techniques relatives au matériel biologique

### Transformation bactérienne : choc thermique

De manière générale, la transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

1. Placer 100 µl de bactéries  $\text{CaCl}_2$  compétentes dans un eppendorf sur glace.
2. Une fois les bactéries décongelées, ajouter 5 µl du plasmide.
3. Laisser sur glace pendant 45 minutes.
4. Choc thermique pendant 2 minutes dans un bain-marie à 42°C.
5. Ajouter 1 ml de milieu LB liquide.
6. Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C.
7. Etaler 100 µl sur un milieu sélectif approprié et laisser pousser sur la nuit à 37°C.
8. Centrifuger le reste pendant 5 minutes à 5000 rpm puis resuspendre le culot dans environ 150 µl.
9. Etaler le tout sur milieu sélectif approprié et laisser pousser sur la nuit à 37°C.

### Le test blanc/bleu : l' $\alpha$ -complémentation

Ce test permet de détecter facilement les bactéries, dans notre cas *E. coli* DH10B, portant un plasmide recombinant pourvu d'un insert disruptant le gène *lacZ'*. En effet, dans cette souche,

la protéine encodée par l'élément génétique *lacZAM15* ne contient que la partie carboxy-terminal de la  $\beta$ -galactosidase et est donc non fonctionnelle. Il peut néanmoins y avoir une  $\alpha$ -complémentation suite à l'acquisition du plasmide recombinant qui apportant un fragment du gène *lacZ*, *lacZ'* encodant la partie N-terminale de la  $\beta$ -galactosidase. Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède deux fragments de la  $\beta$ -galactosidase formant une protéine fonctionnellement active. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal, substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Quand le test est blanc, il met en évidence les bactéries ayant acquis un plasmide qui contient un insert disruptant le gène *lacZ'* au niveau du MCS, la  $\beta$ -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. Quand le test est bleu, la  $\beta$ -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. Remarquons que les bactéries sans plasmide meurent automatiquement sur le milieu de sélection faute du gène de résistance adéquat. L'ajout d'IPTG dans le milieu de culture déréprimera l'expression de *lacZ'* en inhibant LacI, protéine se fixant sur le promoteur de *lacZ'*.

## Conjugaison

La conjugaison entre bactéries Gram négatives est un transfert horizontal de matériel génétique. La bactérie donneuse amène, via un pili sexuel, un plasmide conjugatif contenant une origine de transfert vers une bactérie receveuse. La souche donneuse possède le plasmide RP4 intégré dans son chromosome qui code pour les protéines nécessaires au transfert conjugatif.

### Protocole

1. Préparer deux précultures : ensemencer, d'une part, 10 ml de LB liquide plus antibiotique(s) approprié(s) avec des *E. coli* S17-1 donneuses transformées avec le plasmide d'intérêt. D'autre part, ensemencer 10 ml de 2YT liquide d'une colonie de *Brucella* receveuse (Nal<sup>R</sup>).
2. Incuber les deux précultures durant une nuit à 37°C sous agitation.
3. Le jour de la conjugaison, prélever 1 ml de la préculture d'*E. coli* S17-1 et ensemencer 9 ml de LB liquide de manière à ce que les bactéries se trouvent en phase exponentielle de croissance quelques heures après.
4. Avant la conjugaison, centrifuger la culture de *E. coli* S17-1 pendant 5 minutes à 5000 rpm afin de culotter les cellules. Eliminer le surnageant et effectuer deux lavages dans du LB liquide pour éliminer les antibiotiques.
5. Resuspendre dans un volume final de 1 ml de 2YT
6. Les cultures de *Brucella* sont centrifugées 5 minutes à 5000 rpm. Le culot est resuspendu dans 500  $\mu$ l de 2YT.
7. Placer un filtre stérile 0,22  $\mu$ m sur une boîte de Pétri contenant du 2YT solide, y déposer 80  $\mu$ l de culture de *Brucella* et 80  $\mu$ l d'*E. coli* S17 lavées et resuspendues.
8. Mélanger et étaler les gouttes de bactéries sur la totalité du filtre.
9. Laisser incuber au moins 1 heure à 37°C.
10. Transférer le filtre dans une boîte de pétri vide et gratter les bactéries sur le filtre dans 1 ml de 2YT et transvaser par la suite dans un eppendorf.
11. Centrifuger l'eppendorf 5 minutes à 5000 rpm, vider le surnageant et resuspendre dans 300  $\mu$ l de 2YT.

12. Etaler les 300 µl sur trois boîtes de Pétri contenant du 2YT additionné d'agents sélectifs (100 µl/milieu). Effectuer des dilutions avant l'étalement si le plasmide à conjuguer est répliatif.
13. Incuber 3-4 jours à 37°C.

Remarquons qu'à l'étape n°10, nous pouvons directement transférer le filtre sur un milieu sélectif.

### Contrôle négatif

Les bactéries donneuses *E. coli* S17-1 sont étalées sur un milieu sélectif contenant de l'acide nalidixique et les *Brucella* (Nal<sup>R</sup>) receveuses sont étalées sur un milieu additionné de l'antibiotique auquel résistent les *E. coli* S17-1 donneuses.

## Coloration (de) Gram

Le concepteur éponyme de cette technique a inventé un moyen de distinguer les bactéries pourvues d'une paroi muréique importante et d'une simple membrane plasmique ou celle pourvue de deux membranes circonscrivant une mince paroi muréique. Le procédé est basé sur la capacité d'une bactérie à retenir le bleu de gentiane après sa précipitation, cas des bactéries à paroi épaisse. La safranine, quant à elle, n'est employée que pour visualiser en rouge les bactéries réfractaires au bleu de gentiane. Dès lors, une bactérie rouge est dite Gram négatif, une bactérie bleue Gram positif.

### Protocole

1. Sur une lame de verre, mettre une goutte d'eau.
2. Toucher une colonie avec un cure-dents stérile et la déposer sur l'eau.
3. Sécher à la flamme.
4. Fixer les bactéries en ajoutant de l'alcool (Vel, Leuven, Belgium) et passer à la flamme.
5. Ajouter le bleu de gentiane (Merck, Darmstadt, Germany) sur la lame et attendre 1 minute.
6. Ajouter le lugol (Merck, Darmstadt, Germany) pour précipiter le bleu de gentiane et attendre 1 minute.
7. Rincer à l'alcool.
8. Rincer à l'eau.
9. Ajouter la safranine (Merck, Darmstadt, Germany) et attendre 1 minute.
10. Sécher la lame en tapotant avec un papier absorbant.

## Infection de cellules hôtes

### Préparation des cellules eucaryotes

Au jour J-1, à partir de flasques de macrophages bovins en sous-confluence :

1. Vider le surnageant.
2. Ajouter 3,5 ml de PBS additionné de trypsine en veillant à immerger le fond du flasque.
3. Après quelques secondes, vider le surplus de solution et incuber 10 minutes à 37°C.



4. Décrocher les cellules grâce à 10 ml de RPMI macrophages bovins (RPMImb) de chez GIBCO® (Invitrogen).
5. Centrifuger la solution récoltée 10 minutes à 200 rpm puis vider le surnageant.
6. Resuspendre dans 1 ml de RPMImb et insérer 20 µl dans un chambre de comptage.
7. Multiplier par  $2 \times 10^5$  la moyenne de trois lignes de cette chambre.
8. Diluer pour arriver à une densité de  $5 \times 10^4$  cellules/ml.
9. Dispatcher 500 µl par puits contenant un coverslip à observer en microscopie à fluorescence.

En parallèle, ensemercer 5 ml de 2YT plus antibiotiques de la souche infectante à tester.

## L'infection

Le jour J :

1. Laver deux fois par centrifugation (10 minutes à 3500 rpm) et resuspension les cultures bactériennes afin d'éliminer les antibiotiques.
2. Prendre la  $DO^{600}$ . Une DO de 1 équivaut à une culture de  $3 \times 10^9$  bactéries par ml.
3. Calculer le volume à ajouter à 5 ml de RPMImb en tablant sur une MOI d'environ 1000, soit  $5 \times 10^7$  bactéries par ml.
4. Mettre 500 µl/puits du RPMImb ensemercé.
5. Centrifuger les plaques 10 minutes à 1200 rpm.
6. Laissez incuber 1 heure à 37°C.
7. Laver 2 fois avec 500 µl PBS (par puits) et remplacer par 500 µl de RPMImb additionné de gentamycine afin d'éliminer les bactéries extracellulaires.
8. Laisser incuber le temps désiré à 37°C.
9. Quand le temps imparti est écoulé, laver 3 fois avec 500 µl de PBS.
10. Fixer les cellules à l'aide de 500 µl de PFA 4%.
11. Laver 3 fois avec 500 µl de PBS.
12. Transférer les coverslip's de plaque (puits remplis de PBS) pour pouvoir sortir du BL3.
13. Recouvrir la plaque de papier aluminium et la mettre au frigo.

Lorsque nous désirons étudier la virulence d'une souche de *B. abortus* au cours d'une infection de macrophages bovins, les étapes 1 à 9 sont identiques à ceci près que les puits ne contiennent pas de coverslip's. Après 3 lavages au PBS, nous lysons les macrophages via du PBS TritonX100 0,1% et incubons la plaque de 10 à 15 minutes à 20°C. Les bactéries issues des cellules eucaryotes sont alors récupérées et dénombrées grâce à des dilutions de 10 en 10 (voir calcul de la MOI).

## Calcul de la MOI

Pour chaque solution de RPMImb ensemercé, effectuer des dilutions de 10 en 10 jusqu'à  $10^{-7}$ . Ensuite, disposer côte à côte 20 µl des dilutions allant de  $10^0$  à  $10^7$  sur une boîte de Pétri carrée inclinée. Sous leur propre poids, les gouttes traversent la boîte. Il suffit alors de mettre les boîtes à l'étuve et de dénombrer le nombre de colonies formées pour chaque dilution après 3 jours. On veillera à ne compter qu'à partir des dilutions où le nombre de bactéries ne dépasse pas environ 150. Uniquement sur ces dilutions, nous recensons le nombre de colonies formées. D'un autre côté, nous additionnons les dilutions prises en compte à l'exception de celles où il n'y a pas de colonie. Nous effectuons le rapport de la première valeur sur la seconde que nous divisons par le nombre de cellules eucaryotes par puits.

## Techniques ayant trait aux anticorps

### Marquage immunocytochimique

Le but de cette manipulation est de révéler la présence ou l'absence d'un composé biologique (protéine, sucre, etc.) grâce à la propension qu'un anticorps a de se lier à ce composé. La révélation effective se fait via un second anticorps couplé à une molécule fluorescente qui reconnaît le premier.

Si la cible de l'anticorps réside à l'intérieur d'une cellule, il faudra avant tout perméabiliser cette cellule pendant 10 minutes avec du PBS + BSA 1% + TritonX100 0,1%.

### Protocole

1. Dans une chambre noire saturée en eau, retourner les coverslip's à marquer sur une goutte de 30 µl de solution PBS + BSA 1% additionnée de l'anticorps murin primaire anti-LPS 12G12 (dilution 500X) pendant 45 minutes.
2. Remettre les coverslip's dans la plaque 24 puits et laver 3 fois avec 500 µl de PBS.
3. Dans une chambre noire saturée en eau, retourner les coverslip's à marquer sur une goutte de 30 µl de solution PBS + BSA 1% additionnée de l'anticorps caprin secondaire anti-anticorps murins couplé à l'Alexa fluor® 568 émettant dans des longueurs d'onde correspondant au rouge (dilution 1000X) pendant 45 minutes.
4. Remettre les coverslip's dans la plaque 24 puits et laver 5 fois avec 500 µl de PBS.
5. Retourner les coverslip's sur lame avec glycergel (milieu de montage), antifading fournit par la firme Dako®.
6. Mettre à l'obscurité pendant au moins trois heures.

## Techniques ayant trait à la microscopie

### Appareillage

Le microscope employé est un Nikon Eclipse E1000 (objectif 100X, plan Apo) et la caméra permettant la prise de micrographies est une Hamamatsu ORCA-ER.

### Préparation d'échantillons de microscopie à fluorescence

1. Activer 1 heure à 37°C les coverslip's en plaque 24 puits avec de la poly-L-lysine.
2. Mettre les bactéries dans les puits appropriés.
3. Centrifuger 10 minutes à 1000 rpm, et éliminer le surnageant.
4. Ajouter 500 µl de PFA 4% dans chaque puits pendant 20 minutes.
5. Laver trois fois avec 500 µl de PBS.

6. Transférer les coverslip's de plaque pour pouvoir les sortir de l'enceinte BL3.
7. Effectuer un marquage immunocytochimique si nécessaire.
8. Retourner les coverslip's sur lame avec glycerol et mettre à l'obscurité pendant au moins 3 heures.

## Molécules fluorescentes

Nom	$\lambda$ excitation en nm	$\lambda$ émission en nm	Révélation
Alexa fluor® 568	578 (vert)	702 (rouge)	Position de l'anticorps couplé
CFP	440 (violet)	480 (cyan)	Protéine, chimérique ou non
FM4-64	558 (vert)	734 (rouge)	Constituants membranaires
GFP	475 (bleu)	509 (vert)	Protéine, chimérique ou non
Hoescht33342	350 (UV)	461 (bleu)	ADN (AT spécifique)
YFP	480 (bleu)	535 (jaune)	Protéine, chimérique ou non

Bibliographie  
et  
iconographie

# Bibliographie

- Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. & Roizes, G. (1988). DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* **170**, 4603-7.
- Ausmees, N. & Jacobs-Wagner, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-47.
- Ausmees, N., Kuhn, J. R. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**, 705-13.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. & Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-51.
- Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhaute, J., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2002). Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**, 945-60.
- Boschiroli, M. L., Foulongne, V. & O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* **4**, 58-64.
- Celli, J. & Gorvel, J. P. (2004). Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**, 93-7.
- Crymes, W. B., Jr., Zhang, D. & Ely, B. (1999). Regulation of podJ expression during the *Caulobacter crescentus* cell cycle. *J Bacteriol* **181**, 3967-73.
- Domian, I. J., Quon, K. C. & Shapiro, L. (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell* **90**, 415-24.
- Domian, I. J., Reisenauer, A. & Shapiro, L. (1999). Feedback control of a master bacterial cell-cycle regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6648-53.
- England, J. C. & Gober, J. W. (2001). Cell cycle control of cell morphogenesis in *Caulobacter*. *Curr Opin Microbiol* **4**, 674-80.
- Evinger, M. & Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J Bacteriol* **132**, 294-301.
- Grunenfelder, B., Rummel, G., Vohradsky, J., Roder, D., Langen, H. & Jenal, U. (2001). Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4681-6.
- Hecht, G. B., Lane, T., Ohta, N., Sommer, J. M. & Newton, A. (1995). An essential single domain response regulator required for normal cell division and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **14**, 3915-24.
- Hinz, A. J., Larson, D. E., Smith, C. S. & Brun, Y. V. (2003). The *Caulobacter crescentus* polar organelle development protein PodJ is differentially localized and is required for polar targeting of the PleC development regulator. *Mol Microbiol* **47**, 929-41.
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165-70.
- Holtzendorff, J., Hung, D., Brende, P., Reisenauer, A., Viollier, P. H., McAdams, H. H. & Shapiro, L. (2004). Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. *Science* **304**, 983-7.
- Hung, D. Y. & Shapiro, L. (2002). A signal transduction protein cues proteolytic events critical to *Caulobacter* cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13160-5.

- Jacobs, C., Hung, D. & Shapiro, L. (2001). Dynamic localization of a cytoplasmic signal transduction response regulator controls morphogenesis during the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4095-100.
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-20.
- Jacobs, C., Ausmees, N., Cordwell, S. J., Shapiro, L. & Laub, M. T. (2003). Functions of the CckA histidine kinase in *Caulobacter* cell cycle control. *Mol Microbiol* **47**, 1279-90.
- Jay P. Sanford, David N. Gilbert, Robert C. Moellering Jr. & Sande, M. A. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 1997* (Antimicrobial Therapy Inc., Vienna, Virginia 22182 US, 1997).
- Jenal, U. & Fuchs, T. (1998). An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *Embo J* **17**, 5658-69.
- Jones, B. D., Lee, C. A. & Falkow, S. (1992). Invasion by *Salmonella typhimurium* is affected by the direction of flagellar rotation. *Infect Immun* **60**, 2475-80.
- Judd, E. M., Ryan, K. R., Moerner, W. E., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2003). Fluorescence bleaching reveals asymmetric compartment formation prior to cell division in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8235-40.
- Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., O'Callaghan, D. & Ramuz, M. (1998). Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* **27**, 99-106.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175-6.
- Kyriakis, J. M. & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69.
- Lam, H., Matroule, J. Y. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**, 149-59.
- Laub, M. T., Chen, S. L., Shapiro, L. & McAdams, H. H. (2002). Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4632-7.
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M. & Shapiro, L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**, 2144-8.
- Lurin, C. (2001). Développement d'approches systématiques pour l'analyse fonctionnelle de familles de gènes. *Ecole thématique Biologie végétale*, 31-36.
- Margolin, W. (2000). Themes and variations in prokaryotic cell division. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 531-48.
- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M. J., Bourg, G., Allardet-Servent, A. & Ramuz, M. (1993). Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol* **175**, 701-5.
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75.
- Morrison, D. K. & Davis, R. J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118.
- Nierman, W. C., Feldblyum, T. V., Laub, M. T., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Alley, M. R., Ohta, N., Maddock, J. R., Potocka, I., Nelson, W. C., Newton, A., Stephens, C., Phadke, N. D., Ely, B., DeBoy, R. T., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M. L., Haft, D. H., Kolonay, J. F., Smit, J., Craven, M. B.,

- Khoury, H., Shetty, J., Berry, K., Utterback, T., Tran, K., Wolf, A., Vamathevan, J., Ermolaeva, M., White, O., Salzberg, S. L., Venter, J. C., Shapiro, L., Fraser, C. M. & Eisen, J. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4136-41.
- Ohta, N. & Newton, A. (2003). The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* **185**, 4424-31.
- Ohta, N., Lane, T., Ninfa, E. G., Sommer, J. M. & Newton, A. (1992). A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10297-301.
- Oka, A., Sugisaki, H. & Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* **147**, 217-26.
- Ouahrani-Bettache, S., Porte, F., Teyssier, J., Liautard, J. P. & Kohler, S. (1999). pBBR1-GFP: a broad-host-range vector for prokaryotic promoter studies. *Biotechniques* **26**, 620-2.
- Ouimet, M. C. & Marczyński, G. T. (2000). Analysis of a cell-cycle promoter bound by a response regulator. *J Mol Biol* **302**, 761-75.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L. & Gorvel, J. P. (1998a). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* **66**, 2387-92.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (1998b). *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect Immun* **66**, 5711-24.
- Poindexter, J. S. (1981). The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microbiol Rev* **45**, 123-79.
- Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041-7.
- Quon, K. C., Marczyński, G. T. & Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**, 83-93.
- Quon, K. C., Yang, B., Domian, I. J., Shapiro, L. & Marczyński, G. T. (1998). Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 120-5.
- Reisenauer, A. & Shapiro, L. (2002). DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. *Embo J* **21**, 4969-77.
- Reisenauer, A., Quon, K. & Shapiro, L. (1999). The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J Bacteriol* **181**, 2430-9.
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. I. & Alon, U. (2002). Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10555-60.
- Rudner, D. Z., Pan, Q. & Losick, R. M. (2002). Evidence that subcellular localization of a bacterial membrane protein is achieved by diffusion and capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8701-6.
- Ryan, K. R., Judd, E. M. & Shapiro, L. (2002). The CtrA response regulator essential for *Caulobacter crescentus* cell-cycle progression requires a bipartite degradation signal for temporally controlled proteolysis. *J Mol Biol* **324**, 443-55.
- Ryan, K. R., Huntwork, S. & Shapiro, L. (2004). Recruitment of a cytoplasmic response regulator to the cell pole is linked to its cell cycle-regulated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7415-20.

- Sheffery, M. & Newton, A. (1981). Regulation of periodic protein synthesis in the cell cycle: control of initiation and termination of flagellar gene expression. *Cell* **24**, 49-57.
- Siam, R. & Marczyński, G. T. (2000). Cell cycle regulator phosphorylation stimulates two distinct modes of binding at a chromosome replication origin. *Embo J* **19**, 1138-47.
- Skerker, J. M. & Shapiro, L. (2000). Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. *Embo J* **19**, 3223-34.
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37.
- Smith, C. S., Hinz, A., Bodenmiller, D., Larson, D. E. & Brun, Y. V. (2003). Identification of genes required for synthesis of the adhesive holdfast in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **185**, 1432-42.
- Sommer, J. M. & Newton, A. (1989). Turning off flagellum rotation requires the pleiotropic gene *pleD*: *pleA*, *pleC*, and *pleD* define two morphogenic pathways in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **171**, 392-401.
- Sommer, J. M. & Newton, A. (1991). Pseudoreversion analysis indicates a direct role of cell division genes in polar morphogenesis and differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Genetics* **129**, 623-30.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259-68.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13831-6.
- Wang, S. P., Sharma, P. L., Schoenlein, P. V. & Ely, B. (1993). A histidine protein kinase is involved in polar organelle development in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 630-4.
- Wheeler, R. T. & Shapiro, L. (1999). Differential localization of two histidine kinases controlling bacterial cell differentiation. *Mol Cell* **4**, 683-94.
- Wu, J., Ohta, N. & Newton, A. (1998). An essential, multicomponent signal transduction pathway required for cell cycle regulation in *Caulobacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1443-8.
- Wu, J., Ohta, N., Zhao, J. L. & Newton, A. (1999). A novel bacterial tyrosine kinase essential for cell division and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13068-73.



# Iconographie

- Ausmees, N. & Jacobs-Wagner, C. (2003). Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 225-47.
- Ausmees, N., Kuhn, J. R. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**, 705-13.
- Bellefontaine, A. F., Pierreux, C. E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J. J. & De Bolle, X. (2002). Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**, 945-60.
- Celli, J. & Gorvel, J. P. (2004). Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**, 93-7.
- Jacobs, C., Domian, I. J., Maddock, J. R. & Shapiro, L. (1999). Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. *Cell* **97**, 111-20.
- Jacobs-Wagner, C. (2004). Regulatory proteins with a sense of direction: cell cycle signalling network in *Caulobacter*. *Mol Microbiol* **51**, 7-13.
- Jensen, R. B., Wang, S. C. & Shapiro, L. (2002). Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 167-76.
- Lam, H., Matroule, J. Y. & Jacobs-Wagner, C. (2003). The asymmetric spatial distribution of bacterial signal transduction proteins coordinates cell cycle events. *Dev Cell* **5**, 149-59.
- Laub, M. T., McAdams, H. H., Feldblyum, T., Fraser, C. M. & Shapiro, L. (2000). Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**, 2144-8.
- Lurin, C. (2001). Développement d'approches systématiques pour l'analyse fonctionnelle de familles de gènes. *Ecole thématique Biologie végétale*, 31-36.
- Moreno, E. (1998). Genome evolution within the alpha Proteobacteria: why do some bacteria not possess plasmids and others exhibit more than one different chromosome? *FEMS Microbiol Rev* **22**, 255-75.
- Ryan, K. R., Huntwork, S. & Shapiro, L. (2004). Recruitment of a cytoplasmic response regulator to the cell pole is linked to its cell cycle-regulated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7415-20.
- Skerker, J. M. & Laub, M. T. (2004). Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 325-37.
- Viollier, P. H., Sternheim, N. & Shapiro, L. (2002). Identification of a localization factor for the polar positioning of bacterial structural and regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13831-6.